

EESTI MAAÜLIKOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Siim-Martin Tirmaste

**KESKKONNA DNA METOODIKA SOBIVUSE
HINDAMINE LÕHILASTE PARASIIDI
(*Tetracapsuloides bryosalmonae*) TUVASTAMISEKS
VEEKOGUDES**

**ASSESSMENT OF eDNA SUITABILITY FOR
SALMONID PARASITE (*Tetracapsuloides bryosalmonae*)
DETECTION IN WATERCOURSES**

Magistritöö

Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia

Juhendajad: PhD. Veljo Kisand

MSc. Siim Kahar

Tartu 2018

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Siim-Martin Tirmaste		Õppekava: Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia	
Pealkiri: Keskkonna DNA metoodika sobivuse hindamine lõhilaste parasiidi (<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>) tuvastamiseks veekogudes			
Lehekülgi: 79	Jooniseid: 12	Tabeleid: 5	Lisasid: 0
Õppetool: PKI hüdrobioloogia ja kalanduse õppetool, VLI vesiviljeluse õppetool Uurimisvaldkond: Bio- ja keskkonnateadused, B260 Juhendajad: Veljo Kisand, Siim Kahar Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2018			
<p>Kliima soojenemine ja antropogeensed stressorid on esile kutsunud proliferaatiivse neeruhaiguse (PKD) üha tõsisemad puhangud ja kiire leviku laienemise, mistõttu pööratakse selle uurimisele üha rohkem tähelepanu. Traditsiooniliste meetoditega on aga haiguse tuvastamine ressursi- ning töömahukas, limiteerides piisavaid uuringuid. Alternatiiviks traditsioonilistele meetoditele hinnati käesolevas töös keskkonna DNA (eDNA) metoodika sobilikkust PKD haigustekitaja <i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i> veeproovidest tuvastamiseks. Laboris välja töötatud metoodika katsetamiseks looduslikes tingimustes analüüsiti kahe vooluveekogu veeproove, kus PKD esinemine oli juba varasemalt teada. Haiguspuhangute esinemisperioodi katva proovivõtuperioodi vältel koguti proovid kummagi veekogu neljast proovivõtukohast, mis paikenesid erinevates veekogu ülem- ja alamjooksu osades. Proovivõtpaikadesse olid paigaldatud temperatuuriandurid, et hinnata veetemperatuuri võimalikku mõju parasiidi esinemisele. Tulemustest ilmnes <i>T. bryosalmonae</i> selgelt kõrgem esinemissagedus alamjooksu proovivõtupunktides. Lisaks omasid haigustekitajate esinemisele positiivset mõju veetemperatuur ja filtreeritud proovikogus. Siiski sõltub eDNA metoodika efektiivsus erinevate tegurite komplekssest koosmõjust, mille täpsemaks välja selgitamiseks on vaja läbi viia täiendavaid uuringuid. Käesolevaid uurimistulemusi saab rakendada metoodika edasiarenduseks ja efektiivsemate ning usaldusväärsemate lahenduste välja töötamiseks.</p>			
Märksõnad: eDNA, proliferaatiivne neeruhaigus (PKD), qPCR			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Siim-Martin Tirmaste		Specialty: Applied biology of aquatic and terrestrial ecosystems	
Title: Assessment of eDNA suitability for salmonid parasite (<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>) detection in watercourses			
Pages: 79	Figures: 12	Tables: 5	Appendixes: 0
Department: Chair of Hydrobiology and Fishery, Chair of Aquaculture Field of research: Biosciences and environment, B260 Supervisors: Veljo Kisand, Siim Kahar Place and date: Tartu, 2018			
<p>Global warming along with the anthropogenic stressors have provoked the rapid dispersion and severe outbreaks of the proliferative kidney disease (PKD), thus it has recently gained a great deal of interest from various fields. Detecting PKD with traditional methods used so far, has been very demanding and time consuming, thus limiting adequate monitoring. As an alternative to the traditional methods, this study aimed to apply the environmental DNA (eDNA) as a resourceful tool to detect the causative organism (<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>) of the PKD from the natural river water samples with known previous precense of the PKD. During the PKD occurrence period (June-September, 2016), water samples were were collected from four different sites from two different rivers. For assessing the possible effect of the water temperature to the parasite prevalence, real-time data loggers were installed into each site. Sampling sites were located in different parts of the rivers in order to assess the distribution of the parasites. Results indicate the higher prevalence rate of <i>T. bryosalmonae</i> in downstream sampling sites in both rivers. In addition, positive effect was detected between the water temperature and the filtered volume related to the PKD prevalence. Hereby it is suggested that the efficiency of the particular eDNA method to detect the PKD agents from wild, depends of complex interaction of various factors and therefore more research needs to be conducted in future. The outcome and the information of given study can be further used for development of more efficient and reliable method to detect the <i>T. bryosalmonae</i>.</p>			
Keywords: environmental DNA, proliferative kidney disease (PKD), qPCR			

SISUKORD

SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Proliferatiivne neeruhaigus	7
1.1.1. PKD levik maailmas.....	8
1.1.2. Nakkuse kulg sammalloomades	10
1.1.3. Nakkuse kulg kalades.....	13
1.1.4. Kliima soojenemise ja antropogeensete tegurite mõju PKD arengule ning levikule	16
1.2. Keskkonna DNA	18
1.2.1. eDNA säilimine veekeskkonnas ja seda mõjutavad tegurid.....	20
1.2.2. eDNA tuvastamine looduslikes veekogudes.....	21
1.2.3. eDNA meetodika eelised ja puudused	23
1.2.4. eDNA võimalikud rakendusvaldkonnad	27
1.2.5. eDNA meetodika etappide kirjeldus	28
1.2.6. Võimalikud vead eDNA tuvastamisel	34
2. MATERJAL JA METOODIKA	38
2.1. Proovide kogumine.....	38
2.2. Proovide filtreerimine	40
2.3. eDNA eraldamine	41
2.4. qPCR	42
2.5. Statistiline analüüs	45
3. TULEMUSED.....	47
3.1. Analüüsi taustinfo.....	47
3.2. Klaasfiiberfiltrite tulemused	48
3.3. Tselluloosnitraat- ja klaasfiiberfiltrite võrdlus.....	53
4. ARUTELU.....	55
KOKKUVÕTE.....	62
KASUTATUD KIRJANDUS.....	64
SUMMARY	77

SISSEJUHATUS

Kliima soojenemine ja antropogeensed stressoreid on põhjustanud arvukaid muutusi looduslikes elupaikades ja nende liigilises koosseisus. Veekeskkonnas on keskmise temperatuuri tõus laiendanud ja kiirendanud mitmete haiguste levikut ning nende mõju erinevatele looduslikele kooslustele (Okamura & Feist 2011). Üheks selliseks haiguseks on proliferatiivne neeruhaigus (ingl. k. *proliferative kidney disease* - PKD). PKD on limaeoselise parasiidi, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, poolt põhjustatud lõhilaste seas leviv parasitaarhaigus, mis võib noorjarkude seas kaasa tuua massilist suremust (Sterud *et al.* 2007). Mitmel pool põhjapoolkeral peetakse PKD-d üheks peamiseks lõhilaste populatsioonide kahandajaks või koguni lokaalsete väljasuremiste põhjustajaks (Burkhardt-Holm *et al.* 2005; Borusk *et al.* 2006). Seejuures on viimasel paarikümnel aastal haigus muutunud üha tõsisemaks ning selle levik on jätkuvalt laienemas (Okamura *et al.* 2011, Vasemägi *et al.* 2017). Globaalselt nähakse PKD suureneva akuutsuse taga just kliima soojenemist ja eutrofeerumist, mis soodustab *T. bryosalmonae* selgrootute peremeeste elutegevust (El-Matbouli & Hoffman 2002; Wahli *et al.* 2002).

Suurenev probleem PKD, aga ka teiste haigustega, on muutnud haigustekitajate võimalikult kiire ning täpse monitoorimise üha olulisemaks, et hinnata haiguste levikut ja nende trende. Traditsioonilised meetodid on aga sageli töömahukad, aeglased ja erinevatel põhjustel ebatäpsed. Seetõttu otsitakse haiguste täpsema ning efektiivsema seiramise jaoks traditsioonilistele meetoditele alternatiivseid lahendusi.

PKD alastes uuringutes ilmneb selgelt traditsiooniliste proovivõtumetoodite keerukus ja puudulikkus. Üheks olulisemaks probleemiks selle haiguse tuvastamisel on tõsiasi, et kala tuleb kinni püüda ja surmata, et läbi viia lahkamine. Saavutamaks usaldusväärsed tulemused, on vajalik uurimusse kaasata piisavalt suur valim, mis aga väikestes või ohustatud populatsioonides ei pruugi olla võimalik ning põhjalik ülevaade haiguse dünaamikast võib jääda ebapiisavaks. Kuna PKD on levinud lisaks looduslikele

populatsioonidele ka kalakasvandustes, lisandub haiguse efektiivsemast monitoorimisest kasusaajate sekka veel vesiviljelussektor.

Üks potentsiaalselt suure võimekusega alternatiiv traditsioonilistele meetoditele haiguste täpsemaks ja efektiivsemaks tuvastamiseks, on kasutada keskkonna DNA-d (ingl. k. *environmental DNA* – eDNA). eDNA metoodika põhineb liikide tuvastamisel läbi nende elutegevusest keskkonda jäänud DNA-st. PKD kontekstis tähendab see *T. bryosalmonae* DNA tuvastamist läbi veeproovi. Metoodika uudsuse ja kasutusvaldkondade spetsiifika tõttu, nende jaoks parimate lahenduste leidmiseks, on täpne metoodika selleks veel vaja välja töötada.

Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada *T. bryosalmonae* tuvastamise võimalikkus läbi eDNA metoodika ja selle tarvis optimaalsete metoodiliste lahenduste otsimine.

Töö koosneb kahest osast, millest esimeses pooles antakse kirjandusel põhinev ülevaade PKD ja eDNA olemusest ning neid mõjutavatest teguritest. Samuti seletatakse lahti eDNA metoodika põhitõed ja käsitlemist vajavad probleemid. Teine, praktiline pool, koosneb *T. bryosalmonae* tuvastamiseks kasutatud metoodika rakendamisest, veeproovide ja veetemperatuuri andmete kogumisest ning nende analüüsist.

Töö hüpotees: eDNA metoodikaga on võimalik tuvastada *T. bryosalmonae* esinemine veeproovides.

Töö autor tänab meeldiva juhendamise eest Siim Kaharit ja Veljo Kisandit, kes aitasid suunata töö käiku, jagasid koostamiseks väärt nõuandeid ning materjale. Lisaks juhendajatele tahab töö autor tänada idee autorit Anti Vasemäge ja töö koostamisel suureks abiks olnud Lilian Pukki ja Ilkka Nousiaineni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Proliferatiivne neeruhaigus

Proliferatiivne neeruhaigus (ingl. k. *proliferative kidney disease* - PKD) on limaeoselise (*Myxozoa*, hk. *Cnidaria*) endoparasiidi, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, poolt põhjustatud lõhilaste noorjarkude seas leviv parasitaarhaigus. PKD epideemia võib noorjarkudel põhjustada massilist suremust, haiguse üleelamisel võivad täiskasvanud isendid olla resistentsed ning jääda nõnda haiguse kandjateks ja potentsiaalseteks levitajateks (Sterud *et al.* 2007; Dash & Vasemägi 2014). Mitmel pool põhjapoolkeral peetakse PKD-d üheks peamiseks lõhilaste populatsioonide kahandajaks või koguni lokaalsete väljasuremiste põhjustajaks (Burkhardt-Holm *et al.* 2005; Borusk *et al.* 2006). Lisaks looduslikele populatsioonidele on haigus ohuks kalakasvandustes ja haudemajades, kus suremus võib küündida 100 %-ni (Wahli *et al.* 2007).

T. bryosalmonae keeruline elutsükkel sisaldab peale lõhilaste veel magevee sammalloomi (hk. *Bryozoa*), keda peetakse parasiidi primaarseteks peremeesteks (Carraro *et al.* 2017). Haiguse kulg ja levik on suuresti mõjutatud veetemperatuurist, olles soodustatud soojemates oludes. Kuigi lõhilased on jahedaveelised liigid, võib haigust pidada põhjapoolkera populatsioonides üha tavapärasemaks ning selle trend on jätkuvalt kasvav (Tops *et al.* 2009; Marcos-López *et al.* 2010; Okamura & Feist 2011; Okamura *et al.* 2011; Bruneaux *et al.* 2016; Carraro *et al.* 2016). Haiguse suureneva akuutsuse taga nähakse enamasti kliima soojenemist ja eutrofeerumist (El-Matbouli & Hoffman 2002; Wahli *et al.* 2002). Märksa kiirema ja lokaalsema haiguspuhangu võivad põhjustada paisud vooluveekogudes. Paisutuse tulemusena soojeneb veekogu alamjooks, luues soodsad kasvutingimused sammalloomade ja ühtlasi ka parasiitide elukeskkonnale.

PKD haiguspuhanguid on täheldatud juba 20. sajandi algusest (Okamura *et al.* 2011), kuid alles 1980-ndate esimeses pooles avastati selle põhjustajana ainuõõssed (Kent & Hedrick 1985). PKD allikas ei olnud teada kuni 1990-ndate lõpuni, mil selle selgootuteks

peremeesteks tuvastati magevee sammalloomad (Anderson *et al.* 1999). Magevee sammalloomad on bentilised filtreerijad, kelle poolt moodustatavad kolooniad võivad kasvada piiramatul suuruseni (Wood & Okamura 2005). Kuigi üldiselt peetakse sammalloomi soojade ja eutroofsete veekogude lembesteks, taluvad nad laias vahemikus keskkonnatingimusi, alates jahedatest oligotroofsetest kuni soojade rohketoitelisteni, nii lentilistes kui ka lootilistes veekogudes (Hartikainen *et al.* 2009). Peamiselt piirab sammalloomade elutegevust liigne avatus päikesekiirgusele ja nende kinnitumiseks vajaliku kõva substraadi puudumine (Wood & Okamura 2005).

1.1.1. PKD levik maailmas

PKD on laialt levinud põhjapoolkeral nii looduslikes populatsioonides kui ka kasvandustes, seejuures on haigusele vastuvõtlikud teadaolevalt kõik lõhilased (Okamura *et al.* 2011). Läänemeres Soome lahe meriforelli populatsioonides on PKD levinud ja kliima soojenedes on haigus tõenäoliselt sagenemas ka põhjapoolsemates populatsioonides (Dash & Vasemägi 2014). PKD leviku laienemist ja üha laastavamalt mõju looduslikes populatsioonides kinnitavad samuti uuringud Põhja-Ameerikas (Henderson & Okamura 2004), Šveitsis (Wahli *et al.* 2007), Islandil (Kristmundsson *et al.* 2010), Austrias (Gorgoglione *et al.* 2016), Soomes (Vasemägi *et al.* 2017) ja Norras (Mo & Jørgensen 2016), kus on lisaks täheldatud kalavarude vähenemist. Näiteks vähenes 2006. a. Aelva jões kesk-Norras, peale tõsist PKD puhangut lõhe (*Salmo salar*) tähnikute arvukus 85 % (Sterud *et al.* 2007). Nimetatud haiguspuhang märkis PKD areaali olulist laienemist põhja suunas. 1990-ndate lõpus Šveitsis käivitatud uuring kinnitab samuti PKD olulist mõju sealsete jõeforelli (*Salmo trutta morpha fario*) varude vähenemises (Borsuk *et al.* 2006). Olukorra tõsidust rõhutab ka hiljuti USA-s Yellowstone'i jões, *Prosopium williamsoni* (perekond rullsiiglased) populatsioonis puhkenud PKD epideemia, mistõttu suleti ajutiselt 300 km pikkune jõelõik, et vältida parasiidi võimalikku edasist levikut inimtegevuse tõttu (Hutchins *et al.* 2017; Carraro *et al.* 2017).

Võimalik, et haiguse teadaolev levila on arvatust oluliselt laiem kuna see võib, tänu madalatele temperatuuridele või peremehe kehvale seisundile, püsida varjatud staadiumis

ja on seega raskesti tuvastatav. Keskkonnaseisundi muutumisel parasiidile soosivas suunas, võib sellisest olukorrast kiiresti areneda mastaapne PKD epideemia (Sterud *et al.* 2007). Levila alahindamisel võivad rolli mängida ka valediagnoosid kui surma põhjuseks võidakse lugeda sekundaarseid haigusi või takistavad õige diagnoosi panekut ebapiisavad teadmised ja varustus. Traditsiooniliste meetoditega tuleb PKD tuvastamiseks kala hukata, mistõttu jäävad valimid üldiselt väikesteks (Feist *et al.* 2002; Wahli *et al.* 2007). Madala *T. bryosalmonae* arvukuse korral ei pruugi väikesest valimist piisata, et haiguse esinemine tuvastada (Feist *et al.* 2002). Probleemiks on olnud samuti väikesearvuliste populatsioonide, haruldaste või ohustatud liikide uurimine, kus proovide arv on minimaalne või väljapüük isegi keelatud.

Haiguse levimisel veekogudes on mitmesuguseid viise: sammalloomade kolooniate fragmenteerumine ja statoblastide (sammalloomadele unikaalne aseksuaalne paljunemise viis) kandumine vooluga, *T. bryosalmonae* eoste triivimine (ei uju, eluiga alla 24 h) ning levik läbi nakatunud kalade (Freeland *et al.* 2000; de Kinkelin *et al.* 2002; Okamura *et al.* 2011). Veekogude vahel võib levimine toimuda vooluga, kalade, lindude ja teiste loomadega, samuti inimtegevuse tagajärjena (Henderson & Okamura 2004). Anadroomsete lõhilaste puhul võib haigus levida uutesse veekogudesse kodujõega eksimise korral (läbi latentselt nakatunud kalade), nt. Läänemeres võib see esineda ca 2 % lõhedest (Carlin 1969 ref Rannak *et al.* 1983: 88).

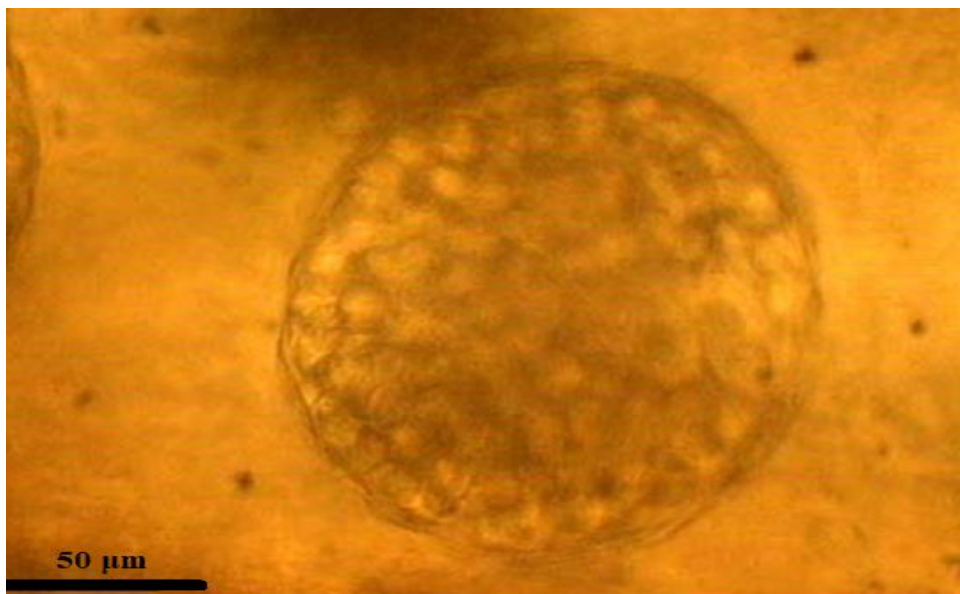
Nii nagu inimtegevus on kaasa aidanud paljude kalaliikide levikule, võib see olla sarnaselt ka sammalloomade ja *T. bryosalmonae* puhul. Sellised liikumised võivad laiendada haiguse geograafilist levikut ja muuta virulentsuse tegureid, kuna tekivad uued kombinatsioonid kalade, sammalloomade ja parasiitide vahel (Okamura *et al.* 2011). Hea näitena inimõjulisest kalade liikumisest võib tuua nt. vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), keda on massiliselt introdutseeritud üle kogu maailma. Tegevuse kaasnähuna saavad läbi nakatunud kalakarja levida ka haigused, mis võivad kaasa tuua haigusjuhtude ning nende tõsiduse suurenemise (Poulin *et al.* 2011).

Levik pikkade vahemaade taha võib toimuda ka laevanduse abil, nii näiteks on leitud Ida-Aasia sammallooma liik *Asajirella gelatinosa* Panama kanaliga ühendusest olevast veekogust (Wood & Okamura 1999). Eksootiliste liikide statoblaste on leitud ka laevade ballastvee setetest Suur Järvistus Põhja-Ameerikas (Kipp *et al.* 2010). Levik ebasoodsates

tingimustes on võimalik tänu statoblastide suurele vastupidavusele, elades üle isegi loomade seedekulga läbimise (Figuerola *et al.* 2003).

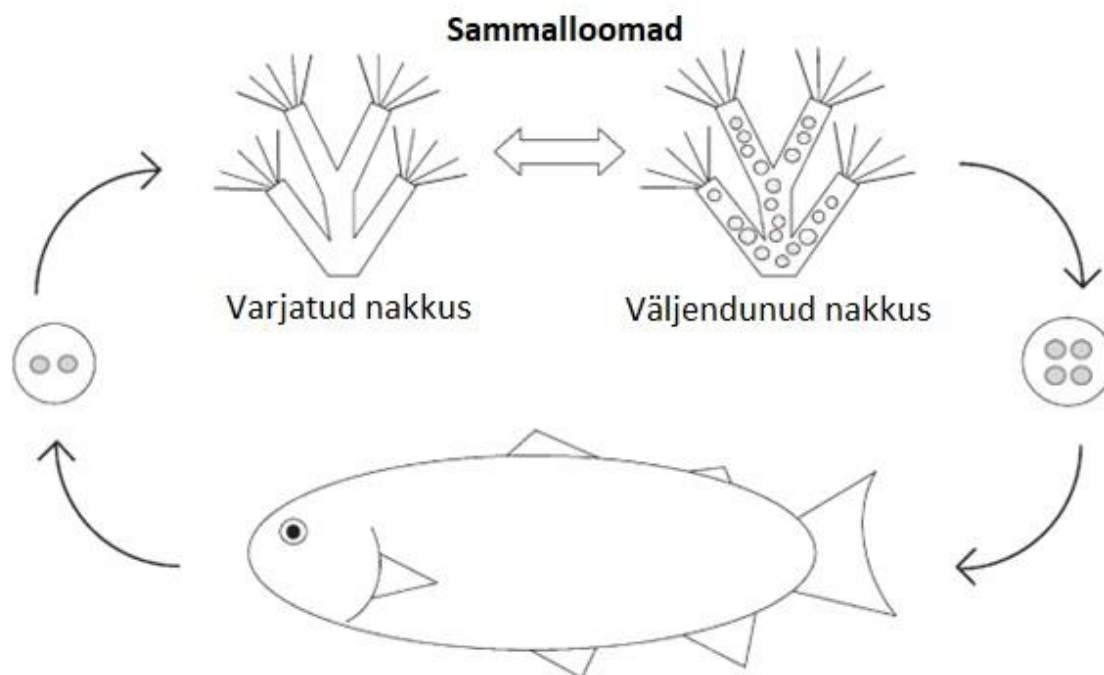
1.1.2. Nakkuse kulg sammalloomades

Sammalloomade parasiidiga nakatumine kulgeb esialgu varjatud (latentse) faasina, kui selle üherakulised vormid seonduvad nende kehapinnaga (Morris & Adams 2006a). Kinnitumine peremehe külge toimub polaarkapslite abil, mis on väljalükatavate filamentidega rakusisesed organellid (Okamura *et al.* 2011). Infektsiooni teises (väljendunud) faasis arenevad üherakulistest vormidest hulkraksed eoskotid (joonis 1), mis prolifereeruvad peremehe kehaõõnsustes (Canning *et al.* 2000; Morris & Adams 2007). Moodustunud eoskotid (diameeter < 350 µm) hakkavad vabastama küpseid eoseid (diameeter ~ 20 µm), mis sisaldavad kahte amöboidset rakku ja nelja polaarkapslit (Canning *et al.* 2000; McGurk *et al.* 2005). Üks täiskasvanud vorm (eoscott) võib sisaldada 2800-4000 eost (Martin *et al.* 1997; Okamura *et al.* 2011). Meioos eose arengu käigus võib viidata sammalloomadele kui peaperemeestele (Canning *et al.* 2000).



Joonis 1. Moodustuvate eostega valmiv eoscott sammallooma kehaõõnsuses (McGurk *et al.* 2006)

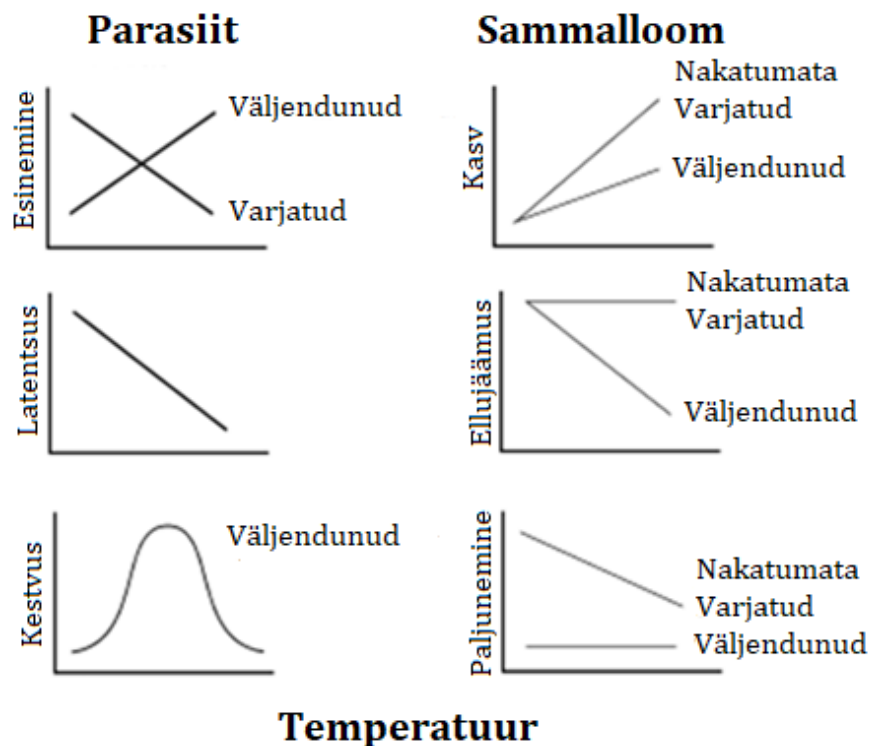
Sammalloomast vette vabanenud eosed kinnituvad kala lõpustele, mis on esimeseks etapiks kala tabandumisel parasiidiga (joonis 2). Eostest vabanemine aga ei taga sammalloomadele nakkuse kadumist ning parasiit võib jääda ringlema varjatud ja väljendunud staadiumi vahele (Okamura *et al.* 2011). Tops *et al.* (2009) katsetest selgus, et 63 % juhtumitest ($n = 40$) taastus varjatud nakkus peale eoste kadumist.



Joonis 2. *T. bryosalmonae* elutsükkel. Kalast vabanenud eosed (kahe polaarkapsliga) nakatavad sammallooma ja põhjustavad selle varjatud nakatumise. Nakatumise väljendunud faas toob kaasa hulkraksete eoskottide moodustumise, millest vabanevad eosed nakatavad kala. Sammalloomadel võib parasiidi elutsükkel vahelduda ka varjatud ja väljendunud faasi vahel (Okamura *et al.* 2011)

Laboratoorsetest katsetest *Fredericella sultana*-ga (magevee sammalloom) on selgunud, et veetemperatuuri tõustes areneb sammalloomal väljendunud nakkus (eoseid moodustav), temperatuuri alanedes taandub haigus üldiselt jällegi latentsesse faasi (Tops *et al.* 2006). Lisaks toimub kõrgematel temperatuuridel väljendunud nakkuse kujunemine kiiremini ning suureneb kaladele nakatavate eoste vabastamine sammalloomadelt (Tops *et al.* 2006). Soojadel suvedel, kui veetemperatuur tõuseb peremehele ebasobivalt kõrgeks, taandub väljendunud nakkus sageli jällegi varjatud staadiumisse (Tops *et al.* 2009). Parasiidi

arengu sõltumine temperatuurist on seletatav asjaoluga, et soojemad tingimused soodustavad sammalloomade kasvu ja loovad neile paremad toitumistingimused (Tops *et al.* 2009). Nende suurenenud biomass loob omakorda parasiitidele laiema kasvupinna parasiteerimiseks ning soodustab *T. bryosalmonae* prolifereerumist selgrootutes peremeestes (Tops *et al.* 2006). Sammalloomadele sobilikes tingimustes suureneb ka nende taluvus parasiteerimise suhtes, mis viitab, et *T. bryosalmonae* arengustaadium ja –kiirus sõltuvad peremehe konditsioonist. Nii püsib parasiit sammallooma kehva seisundi korral ainuraks staadiumis, omades peremehele minimaalset mõju (Okamura *et al.* 2011). Väljendunud nakkuse korral aeglustub sammallooma kasvukiirus ja tõuseb suremus (joonis 3). Latentse nakatumisega ja nakatumata sammalloomade kasvukiirus on üsna sarnane. Ringlemine kahe staadiumi vahel tagab parasiidile sammalloomade maksimaalse ärakasutamise.



Joonis 3. *T. bryosalmonae* ja sammallooma reaktsioonid temperatuuri tõusule (Okamura *et al.* 2011)

Väljendunud nakkuse sage esinemine hiliskevadel ja sügisel võib olla tingitud ringlemisest varjatud ja väljendunud nakkuse vahel (Tops *et al.* 2006). Sagedasemat esinemist soodustavad nendel perioodidel aset leidvad primaarproduktiooni maksimumid, mil hoogustub sammalloomade kasv ja laienevad kolooniad (Okamura *et al.* 2011).

1.1.3. Nakkuse kulg kalades

PKD-ga võivad nakatuda kõik lõhilased, kes ei ole varasemalt *T. bryosalmonae*-ga kokkupuutes olnud, kuid haigusele on kõige haavatavamad nende noorjärgud (Okamura *et al.* 2011). Noorkalad, kes on üleelanud kokkupuute *T. bryosalmonae*-ga, ei omanda üldjuhul järgneval aastal temperatuuri tõustes patoloogilist PKD-d (Foott & Hedrick 1987; de Kinkelin & Lorient 2001), mis viitab tõenäoliselt nakkusjärgselt omandatud immuunsusele (Okamura *et al.* 2011). McGurk *et al.* (2006) katsetest vikerforelliga selgus, et kontrollitud tingimustes võib patoloogiline PKD välja kujuneda nakatumisel kõigest ühe või mõne eosega. Kalade nakatumine parasiidiga toimub eoste amöboidsete rakkude kaudu, mis tungivad enamasti läbi lõpuste või naha veresoonkonda. Veresoonkonda jõudnuna toimub üherakuliste *T. bryosalmonae* eoseväliste staadiumite paljunemine enne neeru, haiguse peamisesse kahjustuspiirkonda, või põrna jõudmist (Canning *et al.* 2002). Nakatumine põhjustab kalade noorjärgude neerude põletikulist proliferatsiooni, kehvveresust ning häireid osmoregulatsioonis (Bettge *et al.* 2009; Dash & Vasemägi 2014). Viimane võib eriti rängalt mõjuda anadroomsetele kaladele just nende merre laskumise ajal (Foott *et al.* 2005).

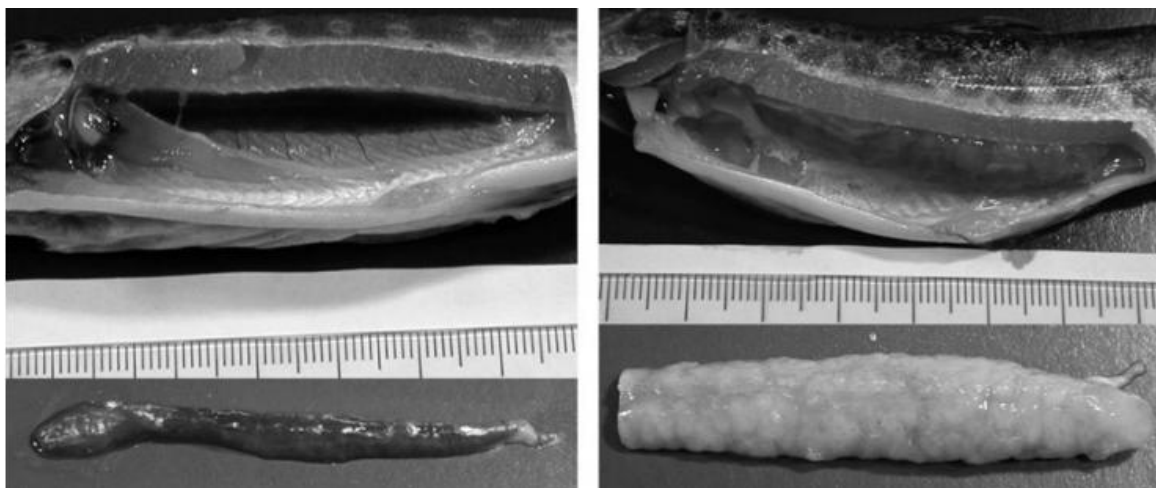
Nakatunud kala neerus toimub selle põletikuline prolifereerumine, mis põhjustab selle kudedes tõsiseid kahjustusi. Gorgoglione *et al.* (2016) uuringutes mõõdeti neeru suurenemiseks isegi kuni 6,74 % kala kogumassist (normaalne 1,23 %). Looduslikes tingimustes on enamik füsiopatoloogilisi sümptomeid tugevasti seotud neeru hüperplaasiaga, vähem parasiitide hulgaga (Bruneaux *et al.* 2016). Samast uuringust selgus, et väikese parasiidi arvukusega peremeestel puudus või esines neeru hüperplaasia vähesel määral, keskmise või kõrge parasiidi kogusega kalade neerud olid keskmiselt kuni

väga turses. Lisaks järeldus ka PKD ägeduse (neeru paistetuse) ja kala kõrgema temperatuuritaluvuse (ingl. k. *upper thermal tolerance*) vaheline negatiivne korrelatsioon.

Arvatakse, et tavatingimustes elab kala nakatumise üle, kuna peremehe surm enne eoste moodustumist tähendaks nende lõpp-peremehe staatust (Okamura *et al.* 2011). Haiguse üleelamisel rakendub parasiidil strateegia, kus kala neerutorukestesse jäävad püsima eoseid moodustavad staadiumid, seejuures võivad parasiidi poolt tekitatud kahjustused täielikult paraneda ja taastada oma normaalse funktsiooni (Morris *et al.* 2005). Eosed, suurusega 14 x 16 µm, vabanevad vette uriiniga ja vähemalt meriforelli (*Salmo trutta*) ning ameerika paalia (*Salvelinus fontinalis*) puhul, on need võimelised sammalloomi taas nakatama (Hedrick *et al.* 2004; Morris & Adams 2006b; Grabner & El Matbouli 2008). Kuna aga nakatumisel parasiidiga kaasnevad kaladel tõsised tüsistused ja mitte kõikidelt liikidelt vabanevad eosed ei ole võimelised sammalloomi nakatama, võib see viidata, et lõhilased on juhuslikud lõpp-peremehed (Tops *et al.* 2009).

Eoseid moodustavaid järkusid on meriforellil, harjusel (*Thymallus thymallus*) ja lõhel tuvastatud ka ajal mil üldiselt haiguse esinemist ei täheldata (Morris *et al.* 2000). Eoste leidumine täiskasvanud kalades ja talveperioodil, võib viidata nende moodustumisele pika aja vältel (Abd-Elfattah *et al.* 2014) ehk isegi kala terve eluaja jooksul (Okamura *et al.* 2011). Kuna aga selles faasis on *T. bryosalmonae* mõju kalale tühine, siis üldjuhul jääb see märkamatuks.

PKD välisteks patoloogilisteks tunnusteks nakatunud kaladel on kahvatud ja aneemilised lõpused, tumenenud keha ning paistetunud kõht. Seesmiselt on näha neeru ja põrna märgatav suurenemine koe rakkude proliferatsiooni ning põletikulise reaktsiooni tõttu (joonis 4). Kuigi enamasti omandavad kalad nakatumise korral tõsised patoloogilised tunnused, ei kehti see näiteks ameerika paalia kohta (Feist & Bucke 1993). Lisaks erineb liigiti suurel määral moodustavate eoste arv (Feist & Bucke 1993) ja tõenäoliselt ka suremus (Mo *et al.* 2016).



Joonis 4. Meriforelli normaalne neer (vasakul) ja PKD-ga nakatunud kalal (paremal). PKD-ga tabandunud kala neeru puhul on selgesti märgatav selle proliferatsioon ja põletikulisus (Okamura *et al.* 2011)

PKD areng on sõltuv veetemperatuurist, kuna kala spetsiifilised immuunvastused on madalatel temperatuuridel üldiselt mahasurutud (Le Morvan *et al.* 1998). Gay *et al.* (2001) on välja pakkunud, et kala immuunvastuse suurus sõltub rohkem parasiitide hulgast kui veetemperatuurist. Siiski tasub arvestada asjaoluga, et kõrgemate temperatuuride juures võimendub kala immuunvastus parasiidile ja põhjustab läbi põletikuliste reaktsioonide raskemaid tüsistusi neeru kudedes (Bettge *et al.* 2009). Nii võib ägenenud immuunvastus mõjuda kalale letaalselt.

Haiguse väljakujunemiseks (väljendunud nakkus) peab veetemperatuur ületama 15 °C, kuigi kala võib nakatuda ka madalamatel temperatuuridel (Gay *et al.* 2001). Alla 15 °C veetemperatuuridel PKD-st põhjustatud suremust harilikult ei esine. Haiguse alguses on peamised immuun-regulatoorsed tsütokiinid alla surutud, mistõttu võivad neerus tekkida tõsised tüsistused, nagu ebanormaalselt suurenenud lümfotsüütide arv, granulomatoossed kahjustused ja neerude atroofia (Chilmonczyk *et al.* 2002). Lisaks on granulotsüütide (immuunsüsteemi osad) aktiivsus mahasurutud, mis tõstab omakorda bakteriaalsetesse haigustesse tabandumise riski (Chilmonczyk *et al.* 2002). Seetõttu võib kõrge temperatuur PKD-st tingitud immuunpuudulikkusega kaladel kaasa tuua suurenenud suremuse läbi sekundaarsete haiguste (Feist & Bucke 1993).

Vikerforelli laborikatsete puhul on siiski kindlaks tehtud, et *T. bryosalmonae* on võimeline kaasa tooma kala surma ilma sekundaarsete haigusteta (Bettge *et al.* 2009). Praegusel hetkel puuduvad PKD ravimiseks meditsiinilised meetmed, kasvandustes on võimalik vaid haiguse ennetamine (Skovgaard & Buchmann 2012).

Haigustest tingitud suremus on looduslikes populatsioonides tõenäoliselt alahinnatud, kuna see peab olema piisavalt suur, et olla märgatav (Wootten & McVicar 1982). Lisaks takistavad haigustele jälile jõudmist kiskjad ja raipesööjad.

1.1.4. Kliima soojenemise ja antropogeensete tegurite mõju PKD arengule ning levikule

PKD esilekerkimises on väga oluline roll magevee sammalloomadel, kes vastupidiselt lõhilastele eelistavad soojemaid ja toiteainerikkamaid tingimusi. Seetõttu võib neid sagedasti leida nt. paisude alustel jõelõikudel, kus voolab paisu ees soojenenud ja toiteainerikas vesi. Üldiselt kehtib seaduspärasus, et vooluveekogudes kasvab allavoolu PKD esinemissagedus koos toiteainete ning veetemperatuuriga (Zimmerli *et al.* 2007). Veetemperatuuri tõusul hoogustuv primaarproduktsoon loob sammalloomadele parema toidubaasi ja lubab kolooniatel kiiresti laieneda. Suurenev sammalloomade biomass pakub omakorda *T. bryosalmonae*-le laiemat kasvupinda parasiteerimiseks. Primaarproduktsooni tõusule aitavad kaasa lisaks kliima soojenemisele ka antropogeenset päritolu (peamiselt põllumajandus ja asulate heitved) toiteained. Hartikainen *et al.* (2009) leidsid tugeva seose sammalloomade arvukuse ja toiteainete kontsentratsioonide vahel nii laboris, kui ka looduslikes tingimustes. Lisaks suurenes toiteainete kontsentratsiooni tõusuga kõigil uuritud sammalloomadel vabastatud statoblastide arv, mis panustab sammalloomade ja haiguse levikusse veelgi.

Saksamaa näitel langes Singoldi jõel paiknevas haudemajas tabandumine PKD-ga peale ülesvoolu paikneva reoveepuhastusjaama heitvete ümbersuunamist 1998. a. Samal aastal langes El-Matbouli & Hoffman (2002) uuringute järgi nakatumine PKD-ga haudemajas 15 %-ni, 2000. a. aga 5 %-ni. Eelnevalt jäi nakatumine 40-80 % vahele. Langustrend esines ka looduslikes populatsioonides, kus enne heitvete ümbersuunamist oli selgelt täheldatav

PKD madalam esinemissagedus puhastist ülesvoolu jääval jõelõigul (14 %) võrrelduna allavoolu jääva lõiguga, kus oli nakatunud üle poole valimist (56 %). 1998. a. langesid PKD esinemissagedused nii üles- kui ka allavoolu jäävates jõelõikudes, vastavalt 8 % ja 17 %-ni, 2000. a. aga PKD esinemist ei tuvastatud. Uuringute vältel ei tuvastatud muutusi ka veetemperatuuri režiimis. PKD esinemise ja eutrofeerumise vahelisi seoseid on samuti täheldatud Šveitsi jõgedes, kuid seal mängivad rolli ka erinevad survetegurid kala konditsioonile (Burkhardt-Holm & Scheurer 2007).

Nii looduses kui laboris läbiviidud uuringutest on selgunud PKD sõltuvus temperatuurist, olles maha surutud madalatel temperatuuridel (de Kinkelin & Lorient 2001; Bettge *et al.* 2009; Bruneaux *et al.* 2016). Haiguse tipp saabub harilikult suvel, kui parasvöötmeliste veekogude temperatuur saavutab harilikult oma kõrgetaseme. Kliimamuutuste valguses võib eeldada, et tõusvad suvised keskmised temperatuurid ja sagedasemad kuumalained võivad viia PKD epideemiate sagedasemini ning raskemini (Wahli *et al.* 2002; Sterud *et al.* 2007; Tops *et al.* 2009; Okamura *et al.* 2011; Bruneaux *et al.* 2016). Lisaks haiguspuhangute kestvuse pikendamisele ja suurematele mastaapidele, lühendavad kõrgemad veetemperatuurid nakkuse inkubatsiooniaega. Seetõttu kiireneb kõrgemate temperatuuride juures kahjustuste tekkimine ja tõuseb selle ägedus koos parasiitide arvuga (Bettge *et al.* 2009).

Bettge *et al.* (2009) laborikatsetes saadi 12 °C veetemperatuuri juures suremuseks 5-10 %, 18 °C juures aga koguni 80-90 %. Veetemperatuuri tõusul kasvab kalade hapnikuvajadus ja langeb temperatuuritaluvus, luues organismile lisastressi, mis võib ägedalt kulgeva haiguse korral viia kõrgele suremuse määradeni (Bruneaux *et al.* 2016). Kõrgemate veetemperatuuride korral suureneb kala hapnikuvajadus, mistõttu kiireneb respiratsioon ja lõpusd filtreerivad suuremat hulka vett ning tõuseb võimalus kokku puutuda nakatavate eostega (Strepparava *et al.* 2018).

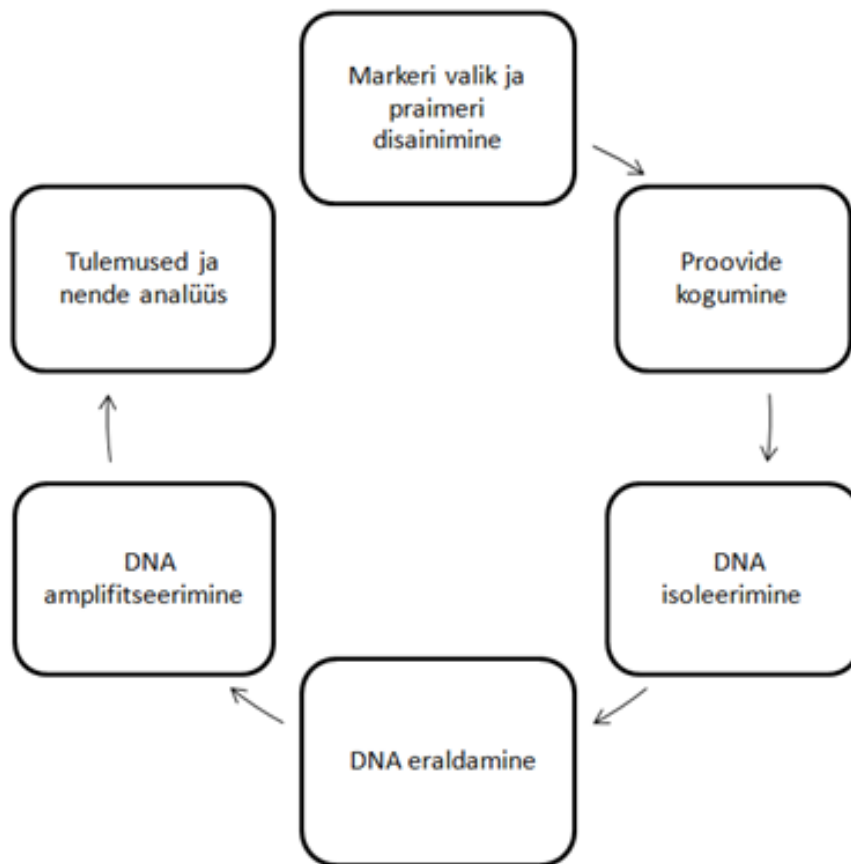
Jahedaveelised lõhilased on kliima soojenemise suhtes tõenäoliselt tundlikumad kui teised mageveelised kalaliigid. Olukorra eskaleerumisele viitab ka juba praeguste andmete järgi PKD levila laienemine põhjapoolkeral. Käesoleval kümnendil on tulnud teateid PKD leviku laienemisest mitmetesse, seni haigusest puutumata olnud piirkondadesse (Kristmundsson *et al.* 2010; Gorgoglione *et al.* 2016; Vasemägi *et al.* 2017). Šveitsi jõforelli (*Salmo trutta morpha fario*) populatsioonide arvukuse languse põhjustajana nähakse just PKD-d, mille mõju on suurenenud seoses sealsete jõgede veetemperatuuri

tõusuga (Borsuk *et al.* 2006). Kliimamuutust ja antropogeenseid stressoreid, mis viivad muutusteni elupaikades, peetakse peamisteks jõeforelli arvukuse kahandajateks (Borsuk *et al.* 2006; Filipe *et al.* 2013).

1.2. Keskkonna DNA

Keskkonna DNA (ingl. k. *Environmental DNA* ehk eDNA) on uudne viis liikide või haiguste leviku määramiseks ja nende monitoorimiseks, ilma neid kinnipüüdmata või otseselt nägemata. eDNA on segu erinevatest organismidest pärinevast mitokondriaalsest, nukleaarsest ja kloroplasti DNA-st, koosnedes nii rakusisese (elus raku osa) kui rakuvälisest (loomulik rakusurm, sellele järgnev lagunemine) DNA-st (Taberlet *et al.* 2012). Meetod põhineb liikide tuvastamisel nende elutegevusest keskkonda jäänud DNA või raku jääkide, nagu näiteks väljaheidet, lima, uriin, nahk, sperma, veri, eosed jne. (Valentini *et al.* 2009; Bohmann *et al.* 2014). Mikroorganismide tuvastamise puhul võib DNA allikaks olla ka terve organism (Thomsen & Willerslev 2015). Keskkonnaproove eDNA metoodikaga uurimiseks on võimalik ammutada pinnasest, väljaheidetest, teistest organismidest, jääst, igikeltsast, veest, setetest jt. allikatest. Antud töös keskendutakse põhiliselt eDNA kasutamisele veekeskkonnas, mida peetakse ka metoodika kõige perspektiivikamaks kasutusvaldkonnaks (Herder *et al.* 2014).

eDNA metoodika kasutamine veekeskkonnas koosneb kuuest põhilisest etapist (joonis 5): geneetilise markeri valik ja alglõigu (ingl. k. *primer*; edaspidi praimer) disainimine; proovide kogumine; DNA isoleerimine; DNA eraldamine; DNA amplifitseerimine; tulemused ja nende analüüs.



Joonis 5. eDNA metoodika etapid

Makroorganismide tuvastamine veeproovidest on välja kasvanud mikroorganismide liigirikkuse hindamisest keskkonnaproovidest, millega alustati 1980-ndatel (Goldberg *et al.* 2015; Thomsen & Willerslev 2015). Veekeskkonnas jõuti makroorganismide tuvastamiseni eDNA metoodika abil esmakordselt 2008. a. Pransusmaal, kui sealsetel märgaladel tuvastati invasiivse härgkonna (*Lithobates catesbeianus*) esinemine (Ficetola *et al.* 2008). Peale nimetatud uurimuse avaldamist sai metoodika arendamine ja kasutamine hoo sisse ning hakkas levima üle maailma kui täpne, organisme säästev ja efektiivne lahendus liikide tuvastamiseks. Kinnitust annab sellele viimaste aastate teaduskirjanduse üha suurenev huvi eDNA kasutamise vastu ja seda eriti just veekeskkonnas (Evans & Lamberti 2018). Metoodika populariseerimisele aitab kindlasti kaasa pidev tehnoloogia areng ja selle muutumine taskukohasemaks. Mitmetel juhtudel on eDNA ennast võrreldes traditsiooniliste meetoditega juba tõestanud kui odavam ja efektiivsem lahendus (Jerde *et al.* 2011; Pilliod *et al.* 2013). eDNA analüüsi täielikku potentsiaali ei ole veel ilmselt

avastatud ega rakendatud, küll aga on selle metoodika rakendamisel teadusmaailmas aina kasvav populaarsus (Laramie *et al.* 2015; McKelvey *et al.* 2016; Evans *et al.* 2017)

Kõige enam võimalusi nähakse eDNA meetodis just invasiivsete võõrliikide, haiguste, ökosüsteemi liigirikkuse ja selle hoiuga seotud valdkondades (Bohmann *et al.* 2014). eDNA võimaldab uurida nii eraklikke, haruldasi kui ka invasiivseid võõrliike, samuti organisme, kelle tuvastamine on traditsiooniliste meetoditega raskendatud või suisa välistatud (Bohmann *et al.* 2014). Sellistel puhkudel võivad traditsiooniliste meetoditega saavutatavad valimid jääda suhteliselt väikesteks. Kuna eDNA proovide kogumine on suhteliselt lihtne, võib see soodustada suuremate ja täiuslikumate andmekogude tekkimist. Rohkem proove tähendab siinjuures aga täpsemaid analüüse, mis võib mõningate muutuste (nt. invasiivsete liikide levik) hindamisel osutada eriti oluliseks. Lisaks avanevad uued võimalused uurida väga raskesti ligipääsetavate või seni uurimata alade liigirikkust, näiteks süvameres või Antarktika järvedes (Bissett *et al.* 2005; Corinaldesi *et al.* 2011).

1.2.1. eDNA säilimine veekeskkonnas ja seda mõjutavad tegurid

Peale DNA vabanemist keskkonda võib see jääda veesambasse püsima, abiootiliste ja biootiliste faktorite mõjul laguneda või muunduda, adsorbeeruda an- ning orgaanilistel osakestel (Levy-Booth *et al.* 2007). Pilliod *et al.* (2014) akvaariumis läbi viidud katsetest selgus, et organismid hakkasid DNA-d vabastama koheselt peale nende sinna paigutamist, 3-5 h pärast saabus tasakaal DNA lagunemise ja lisandumise vahel. Akvaariumi katsetes on eDNA püsivus ulatunud mõnest nädalast (Piaggio *et al.* 2014; Thomsen *et al.* 2012a) kuni 30 päevani (Dejean *et al.* 2011). Tulenevalt uuritavate liikide ja veekeskkondade vahelistest eripäradest, varieerub neis eDNA lagunemise kiirus, nii on see näiteks vooluveses ebapüsivam kui merevees (Dell'Anno & Corinaldesi 2004). Pilliod *et al.* (2014) katsed näitasid, et looduslikus ojas oli eDNA-d võimalik tuvastada kuni 1 h peale organismide sealt eemaldamist. Nii lühike aeg on põhjustatud voolust ja lahustumisest, mitte eDNA lagunemisest. Tingituna eDNA suhteliselt kiirest kadumisest erinevates veekeskkondades, kinnitab uuritava liigi DNA tuvastamine selle hiljutist või vahetut olemasolu.

Erinevused eDNA püsivuses esinevad ka veekogu siseselt, nii on selle lagunemine kiirem kihistunud veekogu soojemas pinnakihis, olles avatud UV-kiirgusele, kui jahedas põhjakihis (Matsui *et al.* 2001). UV-kiirgus võib lõhkuda DNA aluspaaride (ingl. k. *basepair* - bp) sidemed läbi otsese UVB footonite absorbeerumise DNA-s (Ravanat *et al.* 2001). Pilliod *et al.* (2014) katsetest selgus, et peale 8 päevast eksponeeritust päikesele, ei olnud proovidest enam võimalik eDNA-d tuvastada. Seevastu pimedas hoitud proovides leidis eDNA-d ka peale 18-ndat päeva.

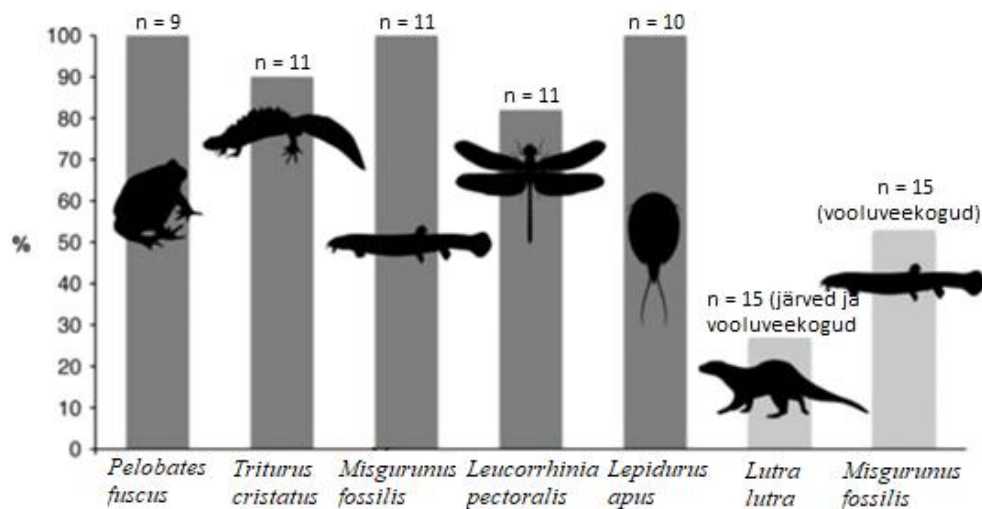
Lisaks UV-kiirgusele on eDNA lagunemine mõjutatud veel endonukleasidest (ensüümid mis lõikavad nukleiinhapped väiksemateks tükkideks), bakteritest ja seentest (Shapiro 2008). DNA lagunemise kiirusel on oma osa endonukleasid ja mikroorganismide aktiivsusel, olles madalamatel temperatuuridel aeglasem või sootuks peatunud (Zhu 2006). Peale raku surma toimub selle struktuuri lagunemine, vabastades keskkonda DNA-d ja rakuvedelikku. Mikroorganismid kasutavad DNA-d toiteainete (süsinik, lämmastik, fosfor) allikana ja oma DNA kahjustuste parandamiseks (Chen & Dubnau 2004). Lagunemise peatamiseks tuleks proovid kiiresti kuivatada, külmutada või paigutada alkoholilahusesse.

eDNA veesambast tuvastamist võib veel pärssida DNA adsorbeerumine setetel ja vees leiduval orgaanikal (Deere *et al.* 1996). Corinaldesi *et al.* (2008) uurisid millised keskkonna faktorid (soolsus, orgaanilise aine sisaldus, redoks-potentsiaal, temperatuur) mõjutavad rakuvälise DNA lagunemist mitmetes meresetetes ja tõestasid, et see ei sõltu ainsast tegurist, vaid mitme faktori kompleksest koosmõjust.

1.2.2. eDNA tuvastamine looduslikes veekogudes

Sõltuvalt uuritava liigi eripäradest ja elukeskkonnast, varieerub sellest eDNA tuvastamise efektiivsus (joonis 6). eDNA abil on lihtsam tuvastada liike, kes elavad väikestes isoleeritud veekogudes, kui maismaal või suurtes jõgedes. Vooluveses levib eDNA kiiresti suurele alale, kuid selle käigus toimub ka lahjendumine. Viimase tõttu raskeneb vooluveekogu suurenedes või kõrgvee perioodi vältel eDNA tuvastamine (Herder *et al.* 2014). Vastupidine olukord valitseb madalvee perioodil või väiksemate veekogude puhul. Siinkohal on oluline tunda uuritava liigi ökoloogiat, tema käitumist erinevate

vooluhulkade, sesoonsuse ja keskkonnamuutuste korral. Pillioad *et al.* (2014) katses paigutati puur 5 salamandrilisega (*Dicamptodon aterrimus*) looduslikku ojja ning sellest 5 m ja 50 m allavoolu võeti eDNA proovid. Kõik 5 m pealt võetud proovid olid positiivsed, 50 m eemalt võetud proovidest uuritavat DNA-d ei tuvastatud. Antud katsest väljendub proovivõtukoha ja uuritava liigi tuvastamise vaheline otsene seos.



Joonis 6. eDNA tuvastamise efektiivsus (qPCR-i meetodi abil) erinevate liikide kaupatiikides (tumehall) ja suuremates veekogudes (helehall). Kõikides proovivõtukohtades oli eelnevalt teada uuritavate liikide esinemine (Thomsen *et al.* 2012a)

Lisaks keskkonna erisustele (hüdrokeemia, hüdroloogia, morfomeetria) mõjutab tuvastamise tõenäosust ka uuritava liigi ökoloogia, mille üheks tähtsamaks osaks on indiviidide paiknemise tihedus uuritaval alal. Nii on näiteks raskem tuvastada territoriaalseid liike, kes paiknevad keskkonnas hajusamalt ja on sageli ka väiksema arvukusega (Thomsen *et al.* 2012a). Sellistel puhkudel muutub proovivõtu aja ja koha valik eriti oluliseks, mistõttu tuleks kaasata uuritava liigi ökoloogiat tundvaid spetsialiste. Mikroorganismid paiknevad seevastu üldiselt keskkonnas tihedalt ja nende sattumine proovi on tõenäolisem. Kuna mikroorganismide puhul satuvad proovi terved organismid, siis on ka nende DNA kvaliteet hea ning tuvastamise tõenäosus suurem (Herder *et al.* 2014).

Deiner & Altermatt (2014) tõestasid, et selgrootute liikide eDNA võib vooluveekogudes levida algallikast suhteliselt kaugele, *Daphnia longispinae* – 12,3 km, kiiljas jõekarp (*Unio tumidus*) – 9,1 km.

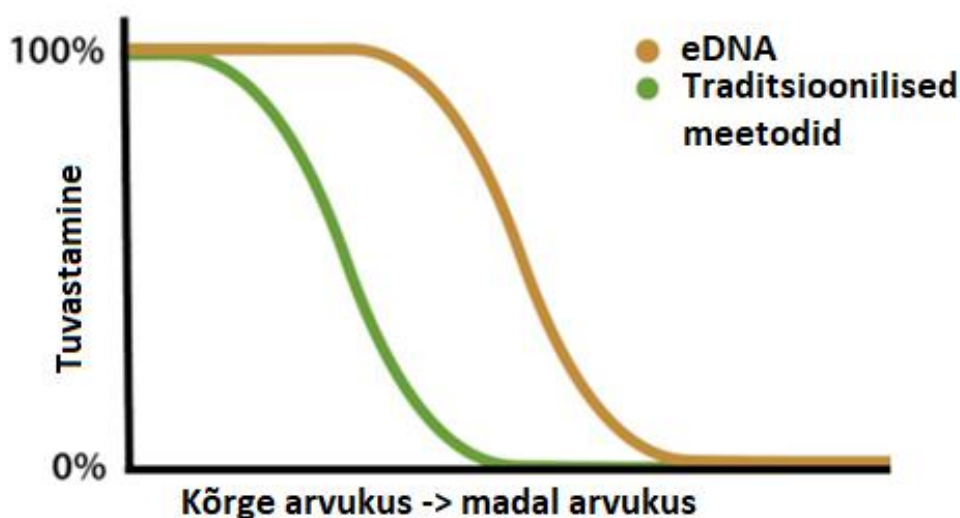
Kalade puhul on eDNA edasikandeks vooluveekogus tuvastatud üle 200 m, tõenäoliselt võib see distants olla veelgi pikem (Jane *et al.* 2015). Uuringutevahelised erinevused eDNA levimises on tõenäoliselt põhjustatud kompleksetest keskkonnamõjuritest nagu vooluhulk, -kiirus, põhja substraat, temperatuur, valgus, pH ja võimalik, et ka muudest faktoritest (Barnes *et al.* 2014; Jane *et al.* 2015; Strickler *et al.* 2015; Jerde *et al.* 2016). Lisaks tasub arvesse võtta meetoodilisi erinevusi. Deiner & Altermatt (2014) viitavad ka võimalusele, et eDNA levimine (püsivus) on liigispetsiifiline, seega ei sõltu vaid valitsevatest keskkonnatingimustest ja eDNA kogusest.

Kontrollitud tingimustes on mitmetes uuringutes (Takahara *et al.* 2012; Thomsen *et al.* 2012a) leitud tugev seos organismide biomassi ja vette vabastatud eDNA koguse vahel. See loob võimaluse eDNA medootika abil hinnata ka uuritava liigi arvukust keskkonnas. Looduslikes tingimustes esineb aga mitmeid faktoreid mis raskendavad eDNA kontsentratsiooni ja biomassi vahelise suhte tõlgendamist. Sõltuvalt organismide paiknemisest proovivõtukoha suhtes jääb eDNA puhul kvantitatiivsete hinnangute andmisel suur roll juhuslikkusele, kuid sama kehtib ka ükskõik millise teise kasutatava meetodi kohta. Juhuslikkuse mõju saab vähendada proovide arvu või mahu suurendamisega. Siiski on mitmetes, looduses läbi viidud uuringutes tuvastatud seos organismide arvu ja eDNA kontsentratsiooni vahel (Pilliod *et al.* 2013; Kymus *et al.* 2015; Lacoursière-Roussel *et al.* 2016).

1.2.3. eDNA metoodika eelised ja puudused

Mitmetest uuringutest on väljendunud eDNA suurem tuvastamise efektiivsus võrrelduna traditsiooniliste meetoditega (Dejean *et al.* 2012; Jerde *et al.* 2011, 2013; Takahara *et al.* 2013; Laramie *et al.* 2015), seda eriti uuritava liigi madala arvukuse korral (joonis 7). Lisaks suuremale tuvastamise tõenäosusele on eDNA metoodikaga saadud negatiivsed

tulemused (uuritav liik puudub keskkonnas) usaldusväärsemad (Herder *et al.* 2014). Seetõttu võib eDNA olla liikide levila hindamisel traditsioonilistest meetoditest täpsem.



Joonis 7. eDNA tuvastamise efektiivsus võrreldes traditsiooniliste meetoditega (Herder *et al.* 2014)

eDNA meetodika eelised tulevad välja haruldaste, eraklike ja väikesearvuliste liikide uurimisel, sest traditsiooniliste meetoditega jääb nende tuvastamisel liiga suur roll juhuslikkusele. Kuna proovide kogumiseks ja esinemise tuvastamiseks pole vaja isendeid püüda, on tegemist mitteinvasiivse meetodiga, mille käigus ei rikuta elupaiku ega kahjustata uuritavaid organisme. Viimane on väga oluline aspekt just ohustatud ja tundlike liikidega tegelemise juures, kus proovide kogumine traditsioonilistel meetoditel võib olla keelatud. Konkreetselt vingerja puhul on eDNA metoodika juba tõestanud suuremat tuvastamise efektiivsust ja seeläbi ka usaldatavust (Herder *et al.* 2014). Kui arvesse võtta vaid välitöid on eDNA metoodika kasutamine lisaks ka odavam kui traditsioonilised meetodid.

Olenevalt keskkonnast võib traditsiooniliste meetodite kasutamine, erinevalt eDNA meetodist, olla raskendatud. Näiteks tiheda taimestikuga veekogudes ei saa rakendada võrgupüüki, samuti on elektripüük väheefektiivne, mistõttu võiks sellistes veekogudes eelistada eDNA kasutamist (Herder *et al.* 2014).

Mõningatel juhtudel annab eDNA meetodika kasutamine parema taksonoomilise täpsuse, eriti kui liigi tuvastamine morfoloogiliste tunnuste põhjal ei ole võimalik. Näiteks kahepaiksete vastsete liigiline määramine võib traditsiooniliste meetoditega osutuda väga keeruliseks (Thomsen *et al.* 2012a).

Ka mitmete haiguste puhul on patoloogilised tunnused väga sarnased või esineb mitme patogeeni koosmõju. eDNA abil oleks aga võimalik määrata konkreetne haigustekitaja või nende liigiline koosseis peremeesorganismis. Sageli ei pruugi mõne haigusega tabandunud organism ilmutada patoloogilisi tunnuseid (nt. PKD varjatud faas lõhilastel), mille tõttu võib nakatumine jääda traditsiooniliste meetoditega tuvastamata, kuna ebaloomuliku suremuse või haigustunnuste puudumisel ei ole põhjust haigust kahtlustada (Wootten & McVicar 1982).

Haiguse tuvastamiseks kaladel tuleb traditsioonilisi meetodeid kasutades isend kinni püüda ja sageli hukata, lahata ning läbi viia laboratoorne ja/või geneetiline analüüs. Arvestades tõsiasja, et kala tuleb kinni püüda ja hukata, on seletatavad ka üsna väikesed valimid ning sellest johtuvad suured haiguse esinemise usalduspiirid (Feist *et al.* 2002; Wahli *et al.* 2007). Probleem kala hukkamises avaldub eriti just väikese arvuliste populatsioonide, haruldaste või ohustatud liikide korral. Väikesed valimid võivad tekitada uuringute vahel suuri erinevusi haiguste proportsionaalses esinemises, kuna juhuslikkusele jääb liiga suur roll. Lisks on traditsiooniliste meetodite kasutamise juures alati olemas võimalus haiguste või invasiivsete võõrliikide mittetahtlikuks levitamiseks läbi proovide ja nende hankimiseks vajalike vahenditega. eDNA puhul on risk eespool mainitule minimaalne, kuna kasutusel on vaid steriilsed materialid, et vältida nende saastumist võõra DNA-ga (Bohmann *et al.* 2014).

Olles üsna uus meetodika, leidub eDNA puhul mitmeid kitsaskohti, seda on ilmestanud katsed kontrollitud ja looduslikes keskkonnas. Kontrollitud tingimustes on selgelt välja joonistunud positiivne seos uuritava liigi arvukuse ja eDNA koguse vahel (Takahara *et al.* 2012; Klymus *et al.* 2015). Looduslikes tingimustes mängivad eDNA lagunemises ja lahjenemises olulist rolli mitmed faktorid. Nii võivad samast paigast võetud proovide tulemused, eeldades sarnast uuritava liigi asustustihedust, olla oluliselt erinevad suurvee ja normaalolude vahel. Vähem oluliseks ei saa lugeda proovivõtumeetodeid, kus eDNA kogus sõltub uuritava liigi paiknemisest proovivõtukoha suhtes. Seetõttu ei saa sageli eDNA koguse põhjal adekvaatselt hinnata absoluutarvukust, kuid sama kehtib ka

traditsiooniliste meetodite puhul. Praegusel hetkel kasutatakse eDNA metoodikat peamiselt tuvastamiseks uuritava liigi puudumist või olemasolu, informatsioon muude tegurite kohta nagu elujärk, konditsioon, paljunemine (viljakus), jääb teadmata (Herder *et al.* 2014).

Hetkel ei ole veel olemas kriteeriume, nagu minimaalne positiivsete proovide arv või positiivsete koopiate arv proovis, mille järgi hinnata uuritava liigi olemasolu keskkonnas (Goldberg *et al.* 2016). Positiivsete tulemuste usaldusväärsuse tagab nende korratavus. Näiteks üks positiivne proov pakub mitme positiivse prooviga võrreldes nõrka usaldusväärsust uuritava liigi esinemisest, kuid kui uuritavat DNA-d on keskkonnas juba algselt vähe (< 100 koopiat/reaktsioonis – nagu see on enamasti eDNA proovides), ei ole qPCR koopiate arv püsivalt järjepidev (Ellison *et al.* 2006).

Lisaks ei suuda eDNA meetod eristada hübriide kuna valdavalt käsitletakse mitokondriaalset DNA-d, mis päritakse vaid emapoolsest liinist (Giles *et al.* 1980). See puudujääk muutub oluliseks situatsioonides, kus invasiivne võõrliik hübridiseerub kohaliku liigiga. Küll aga võib eeldada hübriidide olemasolu, kui eDNA metoodikaga tuvastatakse keskkonnast mõlema hübridiseerumisvõimelise liigi DNA-d (Herder *et al.* 2014).

eDNA metoodika ei suuda eristada elavat ja surnud organismi, mistõttu võib positiivne proov tuleneda ka keskkonnas lagunevast organismist või lihtsalt väljaheidetest (Darling & Mahon 2011). Väljaheidet ja surnud isendid (jäänused) ei pruugi pärineda konkreetsest proovivõtukeskkonnast, vaid võivad olla sinna sattunud teiste tegurite abil (nt. kiskjad, raipesööjad jt.). Väga suurte indiviidide puhul (nt. suurimetajad), võib laguneva organismi DNA püsida keskkonnas kaua aega, andes seeläbi veel pika aja vältel eksitavaid tulemusi.

Puudusena tasub veel mainimist asjaolu, et erinevate praimerite, proovivõtumeetodite ja protokollide kasutamisel ei saa ühe uurimuse tulemusi teistesse üks-üheselt üle kanda (Herder *et al.* 2014). On vajalik, et iga liigi kohta läbiviidav protsess, proovivõttust analüüsimiseni, läbiks põhjalikud testimised enne teistes uuringutes rakendamist.

1.2.4. eDNA võimalikud rakendusvaldkonnad

Haiguste ja invasiivsete võõrliikide puhul on äärmiselt oluline nende kohene avastamine ning vajadusel kiire vastu- või leevendusmeetmete rakendamine. Sellistel puhkudel tulevad välja eDNA meetodi eelised, kuna võõrliikide või haiguste esmakordsel ilmnemisel on nende arvukus üldiselt madal, on nende tuvastamine traditsiooniliste meetoditega väga raske. Samamoodi on sel viisil keeruline hinnata ka nende keskkonnast kadumist ja vastumeetmete edukust.

Vesiviljeluses võivad haiguste tekitatud kahjud väljenduda otseselt läbi kalade hukkumise, ravikulutuste (sh. profülaktiline ravimine) ja tootmisprotsessi pikenemise. Viimane seisneb selles, et haige kala enamasti ei toitu ja seega ka ei kasva. Kui aga on olemas metoodika millega saab haiguse tekkimist tuvastada selle algfaasis, ei teki vajadust profülaktilisele ravimisele ja vastavad meetmed saab tarvidusele võtta alles probleemi ilmnemisel. Positiivse kaasnähuna väheneb ravimite kogus kalades ja keskkonnas, mis on oluline teema arvestades globaalset probleemi ravimiresistentsuse kasvamisega (Suzuki *et al.* 2017).

eDNA üheks paljulubavamaks valdkonnaks peetakse epidemioloogiat või haiguste tuvastamist üldiselt. Kuna paljude haiguste levik on mitmetel põhjustel laienemas, kujutavad need endast üha tõsisemat ohtu erinevatele liikidele ning populatsioonidele. Näitena võib tuua vähikatku, mille tekitaja *Aphanomyces astaci* eoste levimisel jõevähi (*Astacus astacus*) elupaikadesse toimuvad viimase massilised väljasuremised (Wittwer *et al.* 2018). Praeguse metoodika kohaselt tuleb haiguse tuvastamiseks isendid kinni püüda ja läbi viia geneetiline analüüs. Wittwer *et al.* (2018) kasutasid *A. astaci* eoste tuvastamiseks eDNA metoodikat, samaaegselt koguti proove ka traditsiooniliste meetoditega. Aastase proovivõtuperioodi vältel tuvastati haigus mõlema meetodiga kõigis proovivõtupaikades. Seejuures oli *A. astaci* levimus mõlema meetodi tulemustes üsna sarnane. eDNA eeliseks traditsiooniliste meetodite ees on selle väiksem ajakulu ning võimalus haigust usaldusväärsemalt seirata ka talvel (Wittwer *et al.* 2018). Seetõttu võib eDNA metoodika olla parim lahendus rutiinseks vähikatku seireks.

Invasiivsed võõrliigid kujutavad endast tõsist ohtu looduslikule mitmekesisusele ja võivad viia üleilmse homogeniseerumiseni (Pyšek & Richardson 2010). USA näitel arvatakse, et 68 % sealsetest (1890–1991 a.) väljasurnud magevee kalaliikidest olid negatiivselt mõjutatud introductseeritud võõrliikidest (Wilcove & Bean 1994). eDNA metoodikat on

juba edukalt katsetatud mitmete invasiivsete võõrliikide tuvastamise puhul. Invasiivsete hariliku pakslauba (*Hypophthalmichthys molitrix*) ja kirju pakslauba (*Hypophthalmichthys nobilis*) puhul on eDNA tõestanud ka oma suuremat efektiivsust traditsiooniliste meetodite nagu elektri- ja võrgupüügi ees (Jerde *et al.* 2011).

eDNA metoodikat on võimalik kasutada traditsiooniliste meetodite täiendamiseks, nii saavad näiteks ihtüoloogid eDNA abil valida välja kohad, kus uuritavad liigid esinevad ja panustada uuringutele traditsiooniliste meetoditega just neis piirkondades (McKelvey *et al.* 2016). Lõhilaste arvukuse ja populatsiooni trendide hindamiseks kasutatakse ühe meetodina iga-aastast kudepesade loendamist. Ühes veekogus elavad aga tavaliselt mitmed erinevad liigid ja nende kudepesade eristamiseks puudub usaldusväärne ning lihtne metoodika. Strobel *et al.* (2017) kasutasid edukalt USA-s Oregonis Sandy jões, kuninglõhe (*Oncorhynchus tshawytscha*) ja kisutshi (*Oncorhynchus kisutch*) poolt loodud pesade eristamiseks eDNA metoodikat.

Laramie *et al.* (2015) kasutasid edukalt anadroomse kuninglõhe leviku hindamisel eDNA metoodikat. Sama uuringuga tõestati metoodika efektiivne rakendatavus sugukalade jõkke saabumise fikseerimiseks. Samal põhimõttel võiks saada kasutada eDNA-d lõhilaste kudealade taastamise või rändetakistuste likvideerimise edukuse hindamisel.

1.2.5. eDNA metoodika etappide kirjeldus

Markeri valik ja praimeride disainimine

Enamasti kasutatakse eDNA analüüsides markeriks mitokondriaalset DNA-d (mtDNA), kuna iga eukarüootnerakk sisaldab sadu kuni tuhandeid koopiaid mtDNA-d, nuklearseid koopiaid on seevastu vaid kaks (Robin & Wong 1988; Rees *et al.* 2014). Lisaks võib suur osa veeproovides sisalduvast eDNA-st paikneda mitokondrites või väikestes rakkudes, mitte vaba DNA-na keskkonnas (Turner *et al.* 2014).

Keskkonnale eksponeeritult toimub pikkade DNA lõikude kiire lagunemine lühemateks. Tekkinud lühikesete (üldiselt alla 150 aluspaari) DNA fragmentide edasine lagunemine on aeglasem ja nende tuvastamine võrreldes pikkade lõikudega lihtsam (Deagle *et al.* 2006).

Seetõttu peaksid eDNA analüüsid kasutatavad praimerid (kindla järjestusega ning võimendatavale DNA-le komplementaarsed lühikesed nukleiinhappe lõigud) siduma lühikesi DNA lõike, pikemad fragmendid on eDNA uuringute puhul osutunud ebasobilikeks (Riaz *et al.* 2011). Disainimine toimub selleks loodud spetsiaalse tarkvara abil (nt. primer-BLAST või Primer3).

Praimeri disainimine algab markeri (liigile omane spetsiifiline DNA järjestus) valikust ja sõltub uuritavast liigist ja kasutatavast tehnikast (Evans & Lamberti 2018). Markeri valiku eesmärk on kasutada osa uuritava liigi mitokondriaalsest genoomist, mis on rangelt liigispetsiifiline ja võimaldab täpset praimerid sidumist (Bohmann *et al.* 2014; Rees *et al.* 2014). Et tagada praimerite töökindlus testitakse need kõigepealt *in silico* ja *in vitro*. Esimese variandi korral testitakse praimerid bioinformaatiliselt kõigi andmebaasides teadaolevate järjestustega. Testimise tulemusena leitakse kõik liigid, keda saab nende praimeritega potentsiaalselt amplifitseerida. Vastav analüüs viiakse läbi spetsiaalse tarkvaraga, näiteks ecoPCR-iga kasutades primer-BLAST-i (Ficetola *et al.* 2010). Analüüsi tulemusena saadakse süsteem, mis lubab uuritava liigi amplifitseerimist, minimeerides muude liikide amplifitseerimise riski.

In vitro etapis testitakse praimerid uuritava liigi ja sellega lähedases suguluses olevate liikide kudedest eraldatud DNA-ga. Proovid selleks tuleb koguda mitmelt isendilt, soovitatavalt ka erinevatest populatsioonidest, et kaasata võimalik geneetiline variatsioon. Uuritava liigiga lähedases suguluses olevate ja samas keskkonnas elavate liikide (isendite) koeproovid tuleks eraldada ning testida samaaegselt, et hinnata praimerite spetsiifilisust (Herder *et al.* 2014). Testimisega tuleks välja selgitada minimaalne praimeriga tuvastatav DNA kogus (LoD - *Limit Of Detection*). qPCR-i (kvantitatiivne PCR/reaalaja PCR) puhul tuleb hinnata ka madalaimat uuritava liigi DNA kogust mis annab usaldusväärse täpsuse (LoQ - *Limit Of Quantification*). Mainitud kahte parameetrit saab hinnata läbi kindla DNA kogusega lahuste analüüsi (standardi lahjendusseeriad).

Viimaseks tuleb praimerid testida ka *in situ*: vähemalt kolmes erineva esinemissagedusega paigas (kõrge esinemissagedus, madal ning puudub proovis täielikult). Sellisel viisil saab anda hinnangu eDNA meetodikale ja selle praimerite usaldusväärsusele looduslikes tingimustes (Herder *et al.* 2014).

Kuna eDNA on kiirelt populaarsust ja uusi kasutajaid kogumas, laienevad pidevalt võimalused ka uutele ja täpsematele praimeritele. Uusi praimereid ei looda mitte ainult

uutele liikidele (kellel varasemalt praimerid puudusid) vaid täiustatakse ka juba olemasolevate omasid.

Proovide kogumine

Proovivõtmisel ning käitlemisel tuleb igakülselt vältida proovide saastumist võõra DNA-ga ehk kontaminatsiooni ja selle kandmist ühest proovivõtukohast teise. Seetõttu on vajalik proovivõtuvahendite steriliseerimine või ühekordne kasutus. Mitmetest erinevatest paikadest proovide võtmisel tuleb tähelepanu pöörata võimalusele, et DNA võib edasikanduda proovivõtja riietel ja proovivõtuvahenditel.

Enne proovide võtmist tuleb paika panna proovivõtumetoodika, millega tagatakse protsessi usaldusväärsus ja korratavus. Proovivõtmisel tuleb arvestada uuritava liigi bioloogia ja elukeskkonna eripäradega. Nii näiteks ei pruugi seisuvees töötav metoodika toimida vooluveses ja nendest proovide võtmisel tuleb rakendada erinevaid strateegiaid (Thomsen *et al.* 2012a). Sõltuvalt uurimisobjektist ja keskkonnast tuleks valida sobivaim viis proovi ammutamiseks, kas käsitsi veepinnast (Mahon *et al.* 2013), veepinna alt (Strobel *et al.* 2017) või sügavamatest veekihtidest, mille puhul tuleks proovivõtmisel kasutada näiteks batomeetrit (Eichmiller *et al.* 2014) või peristaltilist pumpa (Goldberg *et al.* 2011). Lisaks tuleb arvestada sesoonsusest või erakorralistest oludest tulenevate tingimustega, mis võivad oluliselt mõjutada proovivõtu efektiivsust ja seeläbi ka kogu analüüsi tulemusi.

Lõhilaste puhul võivad muutused asustustiheduses erineda sesoonselt või liigisiselt erinevates vanuserühmades. Anadroomsete liikide puhul tuleb jöest proovide võtmisel arvestada sellega, kas täiskasvanud kalad on momendil jõkke naasnud või noorjärgud juba merre laskunud. Nendest teguritest oleneb eDNA kogus jões, millest sõltub ka tuvastamise efektiivsus. Sellised nüansid muutuvad eriti olulisteks eDNA abil kvantitatiivsete hinnangute andmisel.

eDNA isoleerimine

Veekeskkonnast võetud proovide töötlemisel kasutatakse peamiselt kahte eDNA isoleerimise metoodikat: sadestamist ja filtreerimist (Goldberg *et al.* 2016). Neist esimene põhineb DNA sadestamisel etanooli ning naatriumatsetaadiga ja/või raku jääkide tsentrifuugimisel (Ficetola *et al.* 2008).

Etanooli kasutatakse konservandina, mille lisamisega tagatakse DNA säilimine toatemperatuuril mõnest päevast kuni nädalateni, mis tuleb kasuks kui proovivõtukoht ei asu labori lähistel (Herder *et al.* 2014). Selle meetodi puhul on veeproovi maht võrdlemisi väikene (nt. kolm proovi x 15 ml), mis ei tekita probleeme, kui uuritava liigi arvukus keskkonnas on kõrge ja eeldatav vabastatav DNA kogus on suur. Probleemid võivad aga tekkida uuritava liigi madala arvukuse või nende piiratud liikumise korral, kui eDNA esineb keskkonnas paiguti ja ei pruugi proovi sattuda. Seetõttu võiks antud meetodit kasutades suurendada proovide arvu (Herder *et al.* 2014). Analüüsides proove qPCR-iga ja andes eDNA kogusele keskkonnas kvantitatiivse hinnangu, tagab suurendatud proovide arv lisaks täpsemad tulemused. Teine võimalus meetodi efektiivsuse tõstmiseks põhineb „alamproovide” võtmisel proovipaiga erinevatest osadest. Alamproovid segatakse üheks homogeenseks prooviks, millest omakorda võetakse alamproovid, mis paigutatakse etanooli ja naatriumatsetaadiga täidetud tuubidesse (Biggs *et al.* 2014; Piaggio *et al.* 2014). Sel viisil suureneb võimalus tuvastamaks uuritava liigi eDNA-d. Sadestamise meetod on kasutusel peamiselt väiksemate seisuveekogude puhul (Herder *et al.* 2014).

Teine peamine strateegia põhineb vee filtreerimisel ja on kasutusel enamasti suurtes veekogudes (nt. järved, merelähed) ning vooluvetes (Herder *et al.* 2014). Filtreerimisel on kasutatavad veeproovide mahud suuremad, mis teoreetiliselt tõstab ka uuritava liigi tuvastamise tõenäosust (Wilcox *et al.* 2013). Meetodi puuduseks võrreldes sadestamisega, on selle suuremad kulud, nii ajaliselt (filtreerimisele kuluv aeg) kui rahaliselt (pumbad, filtrid jms.). Lisaks kogunevad suurte koguste filtreerimisel proovidesse ka erinevad inhibiitorid (Herder *et al.* 2014). Peamiseks murekohaks antud meetodi puhul on võimalus, et filtrid ei püüa lagunenud eDNA lõike kinni, kuna nende poorsus on liialt suur. Turner *et al.* (2014) leidsid, läbi järjestikuse filtreerimise (nailonfiltrid – 180; 100; 60 µm ja polükarbonaatfiltrid 20; 10; 1; 0,2µm), et proovis leiduva eDNA kogus suurenes mida väiksema poorsusega filtrit kasutada. Kasutades väga väikese poorsusega filtreid (nt: 0,2

µm), ummistuvad need kiiresti, mistõttu tuleks proovid kõigepealt filtreerida suurema poorsusega filtritega. Kirjanduse järgi leiavad kõige rohkem rakendust filtrid poorisuurusega 0,45 – 3 µm (Rees *et al.* 2014). Hetkel kasutatakse peamiselt nelja tüüpi filtreid: klaasfiiber- (Deiner & Altermatt 2014; Wittwer *et al.* 2018), tselluloosnitraat- (Pilliod *et al.* 2014), polükarbonaat- (Takahara *et al.* 2012) ja nailonfiltrid (Thomsen *et al.* 2012b), mille valik sõltub sihtmärk DNA-st ja kasutatavast eDNA eraldamise protokollist.

Proovide filtreerimist võib läbi viia nii laboris (Jerde *et al.* 2011) kui proovivõtupaigas (Thomsen *et al.* 2012a). Viimase puhul tuleb filtreeritud proovid (filtrid) säilitada alkoholis või jääs kuni laborisse jõudmiseni. Hoiustamine madalatel temperatuuridel või alkoholis on vajalik, et minimeerida DNA lagunemist läbi endogeensete nukleaaside ja mikroorganismide elutegevuse (Zhu 2006). Proovide alkoholis säilitamise ohuks on võimalus, et DNA absorbeerub proovis leiduvas orgaanilises ja anorgaanilises aines, mis mõjutab DNA eraldamise saagist. Tavalised DNA eraldamise meetodid ei suuda juba absorbeerunud DNA-d enam vabastada (Herder *et al.* 2014).

Laboris filtreerimise puhul kogutakse proovid steriilsetesse anumatesse, mida tuleks säilitada jääs. Üldjuhul tuleks eDNA proovid toimetada laborisse ja filtreerida 24 h jooksul (Jerde *et al.* 2013). Kui see ei ole võimalik, võib need kuni filtreerimiseni külmutada, mis pärsib ensümaatilist hüdrolüüsi ja mikroorganismide elutegevust (Thomsen *et al.* 2012b).

eDNA eraldamine

Laboris läbiviidav analüüs algab kvaliteetse DNA eraldamisega. Rakkudest DNA vabastamiseks kasutatakse lüüsimist, mille käigus lagunevad kõik rakulised struktuurid. Kogu protsessi käigus tuleb pöörata tähelepanu proovide puhtuse säilimisele ja üldisele steriilsusele. Ideaalis võiks puhtuse nimel eDNA eraldamine aset leida positiivse õhurõhuga ruumis, kus toimub pidev õhuvahetus ja öösel UV töötlus (Goldberg *et al.* 2016). DNA eraldamise ja puhastamise täpsem protsess sõltub kasutatavast protokollist, antud töös kasutatav protokoll on täpsemalt kirjeldatud „Materjal ja meetoodika“ alapeatükis „eDNA eraldamine“.

eDNA amplifitseerimine

Uuritava DNA analüüsimiseks kasutatakse peamiselt kahte erinevat meetodit: tavaline PCR ja qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Erinevalt tavalisest PCR-st toimub qPCR-i käigus amplifitseerimine ja tuvastamine samaaegselt ühes etapis. See tähendab, et qPCR-i käigus jälgitakse uuritava DNA molekuli võimendamist reaajas ning tulemusi ei tõlgendata geel-elektroforeesilt protsessi lõpus, vaid visualiseeritakse võimenduskõverana. Kasutajasõbralikkusest veelgi olulisem on võimalus qPCR-ga hinnata kui palju kindlat geeni või DNA-d proov sisaldab, luues sisendi hindamaks uuritava liigi arvukust või asustustihedust. qPCR-i produkti tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks kasutatakse fluorestseeruvaid värvaineid (fluorofore).

Üldiselt eelistatakse eDNA amplifitseerimisel qPCR-i tavalisele PCR-le, kuna see on harilikult spetsiifilisem ja tundlikum (Pilliod *et al.* 2014). Usaldusväärselt on võimalik tuvastada vaid mõne aluspaari pikkuseid erinevusi. Suurem tundlikkus tuleneb erinevate kemikaalide kasutamisest, millega on väikese koguse DNA tuvastamine tõenäolisem (Smith & Osborn 2009). qPCR põhineb peamiselt kahel erineval visualiseerimise tehnikal (Garibyan & Avashia 2013). Esimene neist kasutab mittespetsiifilisi fluorokroome, mis seonduvad proovis leiduva kaheaheelalise DNA-ga (SYBR® Green). Teine tehnika kasutab hübridisatsiooni proove, mille puhul tuvastatakse vaid DNA ahelad, mis vabastavad võimendamisel fluoretsenti (TaqMan®). Seetõttu luuakse signaal vaid sel juhul kui proovis leidub uuritava liigi DNA-d.

Kuna eDNA esineb üldiselt madalates kogustes, on selle võimendamise etapp suurenenud tähelepanu all. Võrreldes traditsiooniliste DNA analüüsi protokollidega võib PCR tsüklite arvu suurendada isegi üle 50 (Dejean *et al.* 2012; Ficetola *et al.* 2008; Jerde *et al.* 2011; Thomsen *et al.* 2012a). Suurendades tsüklite arvu, kasvab võimalus tuvastada uuritavat DNA-d, kuid samas tõuseb ka vale positiivse tuvastamise tõenäosus. Stohhastilisuse (väikese DNA koguse puhul ei seo praimer uuritavat DNA-d) vähendamiseks võiks analüüsimisel kasutada mitmeid kordusi (*multi-tube approach*). eDNA uuringutes kasutatakse kuni 12 koopiat ühe DNA eraldamise kohta (Biggs *et al.* 2014). Suurendades koopiate arvu saab qPCR-i kasutades täpsemini arvutada proovides leiduva DNA kontsentratsiooni ja läbi selle hinnata uuritava liigi arvukust (Ellisson *et al.* 2006).

Keskkonnaproovidest eraldatud DNA võib sisaldada inhibiitoreid, mis võivad põhjustada mitmeid probleeme, alates vähenenud meetodi tundlikkusest kuni täieliku reaktsiooni nurjumiseni (King *et al.* 2009). Veeproovide puhul võivad inhibiitoriteks olla nt. humiinhapped ja tanniinid. PCR-i käigus seonduvad humiinhapped DNA-ga, tanniinid pärsvad DNA-polümeraasi (DNA-d sünteesiv ensüüm) sidumist (Opel *et al.* 2010). Inhibiitorite olemasolu saab tuvastada lisades proovile kindla koguse sünteetilisi kontroll-geene, mida looduses ei leidu. qPCR-i tulemusi analüüsides selgub kontroll-geenide olemasolu, läbi mille saab hinnata inhibatsiooni olemasolu proovides (Biggs *et al.* 2014).

Proovidest DNA eraldamisel tuleb samaaegselt teha ka null-kontrollproovid, mis ei sisalda uuritavat DNA-d (Goldberg *et al.* 2016). Ideaalis võiksid kaasatud olla ka looduslikud negatiivsed kontrollproovid, mis on võetud samaaegselt teiste proovidega. Null-proovide negatiivsed tulemused PCR-ga annavad kinnitust, et DNA eraldamise ja PCR-i käigus ei toimunud nt. proovide saastumine. Negatiivse proovi positiivse tulemuse korral tuleb kõik proovid kõrvale jätta (Herder *et al.* 2014). Kui praimerid ei ole rangelt liigispetsiifilised, võivad need siduda ka mitte uuritavate liikide eDNA-ga ja anda samuti vale positiivse tulemuse.

1.2.6. Võimalikud vead eDNA tuvastamisel

eDNA metoodika vead saab jagada kahte rühma: vale positiivsed ja vale negatiivsed (tabel 1). Valepositiivne loetakse I tüübi veaks ja see seisneb uuritava DNA tuvastamisel kuigi sihtmärkliik keskkonnas reaalselt puudub. Kuna sageli võimendatakse väga madalas kontsentratsioonis olevat DNA-d peab PCR olema väga tundlik, see aga soodustab vale positiivse tuvastamist. Vale negatiivne on II tüübi viga ja peegeldab situatsiooni, kus analüüsi käigus uuritavat DNA-d ei tuvastatud, kuigi sihtmärk liik keskkonnas esines. Kui jätta kõrvale inimlikud vead, leidub veel mitmeid tegureid mis võivad viia eksitulemusteni.

Tabel 1. Võimalikud vead eDNA tuvastamisel (Darling & Mahon 2011, modifitseeritud)

Vead uuritava liigi tuvastamisel							
Vale positiivne				Vale negatiivne			
Uuritav DNA puudub, proov positiivne		Uuritav DNA olemas, uuritav liik puudub		Uuritav DNA olemas, ei tuvastata		Uuritav liik olemas, proovis puudub tuvastatav DNA	
Mitte uuritava liigi tuvastamine	Proovi saastumine	DNA keskkonnas püsimine	Alternatiivne seletus DNA olemasolule	Ebapiisav tundlikkus	Vigane meetoodika	Halb DNA kvaliteet	Suutmatus koguda uuritavat DNA-d
Meetodi spetsiifilisust vajab parandamist	Kontroll protokollid ja kvaliteedi kindlus vajab parandamist	Uuritava DNA ja liigi olemasolu vaheline seos vajab täpsustamist		Meetodi tundlikkus vajab parandamist	Meetodi kvaliteedi kindlus ja kontroll vajavad parandamist	Proovi käsitlemise protokoll vajab parandamist	Proovivõtu efektiivsus vajab parandamist

Tegurid „vale positiivsete” tuvastamisel

Proovist uuritava DNA tuvastamisel, kuid sihtmärkliigi keskkonnast puudumisel, võib olla mitu seletust. Esiteks võib uuritav DNA pärineda keskkonnas paiknevast surnud organismist, kelle lagunemine tuvastamatuseni võib võtta väga kaua aega ja mõjutada tulemusi veel pikalt peale elusa organismi keskkonnast kadumist. Teiseks võib uuritav DNA keskkonda sattuda läbi kiskjate, kes on uuritava organismi söönud ühes kohas ja väljaheidet (või jäänused) eritanud teises kohas. Amberg *et al.* (2013) uuringutest selgus, et hariliku pakslaubaga toidetud kormoranide, pelikanide ja kotkaste väljaheidetes leidis selle DNA-d kuni viis päeva peale söömist. Sellisel viisil võivad DNA vektoriks olla väljaheidet, kuid DNA soolestiku läbimise järgse koguse ja kvaliteedi tõttu on see siiski vähetõenäoline.

Vektoritena DNA kandumisel ühest paigast teise võivad talitleda kalastusvahendid (kummikud, muu riietus, püügiriistad), püügi alused või nendel veetavate püügiobjektide jäänused. Laevade ballastveed on võimelised edasi kandma väga suuri koguseid DNA-d, kuid sellise vektoriga tuleb arvestada vaid suurte (laevatatavate) veekogude puhul. Suurtes seisuveekogudes võib eDNA kandumine toimuda hoovuste abil, teoreetiliste arvutuste kohaselt isegi kuni 600 km enne, kui see muutub lagunemise tõttu tuvastamatuks (Thomsen *et al.* 2012b). Erinevate keskkonnamõjurite tõttu leiab lagunemine tuvastamatuseni aset siiski tunduvalt varem.

Kui uuritavat liiki peetakse või kasvatatakse kunstlikes tingimustes, võib selle DNA levida kasvatussüsteemi läbinud heitvetega, kuna heitveed jõuavad varem või hiljem looduslikesse veekogudesse. Vooluveekogude puhul võib selles sisalduv DNA, sõltuvalt voolukiirusest ja DNA lagunemisest, kanduda kiiresti algallikast eemale (Deiner & Altermatt 2014; Jane *et al.* 2015).

DNA suhteliselt pika säilivuse tõttu setetes võib üheks vale positiivse tulemuse allikaks olla setetest vabanenud DNA. Selline võimalus on akuutne setterikastes veekogudes, milleks võivad olla tiigid või madalad järved. DNA setetest vabanemise põhjused võivad olla looduslikud, nagu tuulest põhjustatud turbulents või ka antropogeensed nagu näiteks kaevetööd. Üldiselt tuleb antud viisil vabanenud DNA esinemist lugeda erandiks, kuid mõningatel juhtudel tuleb sellise võimalusega arvestada (Herder *et al.* 2014).

Tegurid „vale negatiivsete“ tuvastamisel

Uuritava DNA olemasolul, kuid selle proovist mitte tuvastamisel võivad olla erinevad põhjused. Orgaanika olemasolu korral proovis võib DNA olla sellega seondunud, ning DNA eraldamise käigus kättesaamatu. Seetõttu on orgaanikarikastes veekogudes DNA eraldamine pärsitud ja standartsetele eDNA eraldamise protokollidele tuleks sisse viia asjakohaseid muudatusi (Herder *et al.* 2014). Teine põhjus uuritava eDNA mitte tuvastamisel võib olla põhjustatud praimerite ebapiisavast efektiivsusest (Darling & Mahon 2011). Praimerite disainimisel tuleb silmas pidada, et laboritingimustes võivad need töötada, kuid looduses, kus leidub erinevaid inhibiitoreid ja eDNA kogused on sageli väikesed, ei pruugi nendest piisata.

Erinevate PCR meetodite puhul võib nende tundlikkus inhibiitorite suhtes olla erinev (Huggett *et al.* 2008). Meetodite vahelised erinevused võivad tuleneda konkurentsist reaktsioonikomponentide üle, nt. EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) olemasolu korral võivad limiteerivaks osutuda Mg^{2+} ioonid. Meetod mille Mg^{2+} vajadus on suurem võib seetõttu sama EDTA koguse korral olla vastuvõtlikum kui väiksema Mg^{2+} vajadusega meetod ja anda kehvemaid tulemusi (Huggett *et al.* 2008).

Lisaks võib uuritava liigi mitte tuvastamine tuleneda puudulikust proovivõtumeetodikast, mis tuleks iga liigi ja keskkonna jaoks eraldi kohandada. Proovivõtukoha valikul on eriti

oluline roll seisuveekogudes uuritava liigi väikese arvukuse korral, kus harilikult eDNA ei levi organismist väga kaugele (Herder *et al.* 2014). Vooluveses levib eDNA hästi, kuid samas on kiire ka selle lahustumine. Vajadusel tuleb vastavalt situatsioonile suurendada proovide arvu või mahtu, mis aga võib suurendada inhibitsiooni mõju.

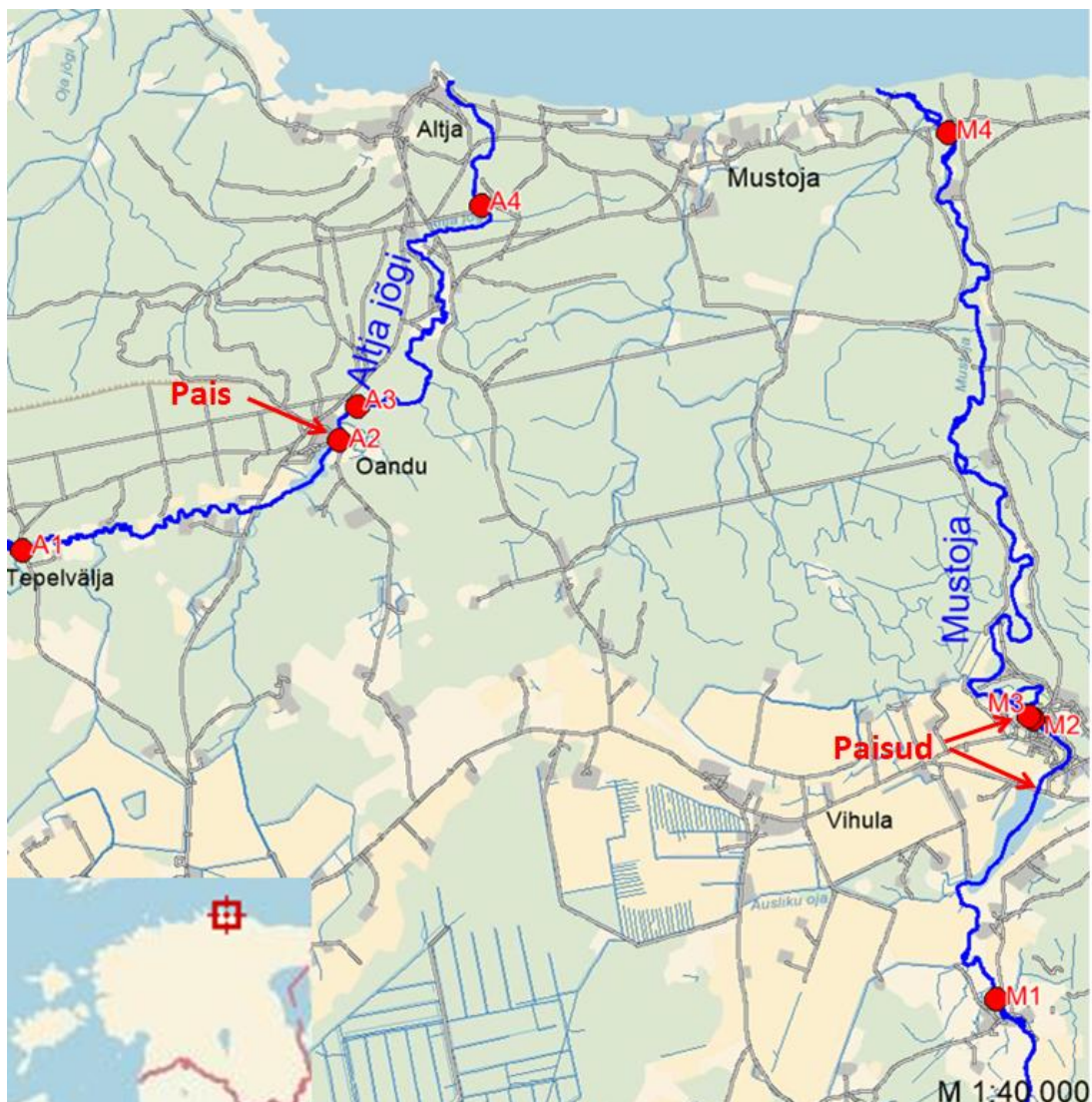
2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Proovide kogumine

Uurimuses kasutatud proovid koguti kahest Soome lahte suubuvast Lääne-Virumaal asuvast vooluveekogust: Mustoja (reg. kood VEE1076000) ja Altja jõgi (reg. kood VEE1076600), kus varasematest teadusuuringutest on PKD esinemine tuvastatud (Dash & Vasemägi 2014). Proovivõtukohtade valikul lähtuti paisude võimalikust mõjust ja üldisest seaduspärasusest, et allavoolu kasvava toitainete sisalduse ja veetemperatuuri tõttu, intensiivistub ka sammalloomade elutegevus, soodustades seeläbi parasiidi levikut. Seetõttu valiti mõlema veekogu üks proovivõtukoht paisudest ülesvoolu, kus varasemalt ei ole PKD-d seni tuvastatud (kasutati nn. loodusliku negatiivse kontroll-proovina (0-proov)), üks alamjooksule ning kaks paisualustele lõikudele (tabel 2, joonis 8). Lisaks kasutati negatiivseks kontrolliks (ingl. k. *no template control* - NTC) poest ostetud joogivett (Saaremaa vesi), mida analüüsiti analoogselt loodusest kogutud proovidega.

Tabel 2. Proovivõtukohtade koordinaadid. A1 – A4 tähistavad Altja jõe, M1 - M4 Mustoja proovivõtupaikasad. Tähtse numbrid kasvavad allavoolu liikudes

Proovi-võtupunkt	Koordinaadid	Märkused
A1	X = 6604217; Y = 616857	Tepelvälja, looduslik 0-proov. Vees palju hõljumit
A2	X = 6604939; Y = 618934	Oandu pais (~ 5 m paisust allavoolu)
A3	X = 6605159; Y = 619051	Oandu küla, Kopra (~ 200 m paisust allavoolu)
A4	X = 6606487; Y = 619864	Maantee sillast ~ 550 m allavoolu
M1	X = 6601268; Y = 623227	Kosta küla, Teni (jalakäijate sild), looduslik 0-proov
M2	X = 6603112; Y = 623461	Vihula veskijärve pais (otse ülevoolu joast)
M3	X = 6603124; Y = 623443	Vihula veskijärve pais (~ 5 m paisust allavoolu)
M4	X = 6606963; Y = 622910	RMK lõkkekoht (sõidutee sillast ~ 100 m ülesvoolu)



Joonis 8. Proovivõtukohtade asukohad

Proovid koguti 2016. a. 7 korral (19.06, 03.07, 19.07, 08.08, 29.08, 23.09, 09.11) ja kolmes korduses. 23.09.2016 koguti proovid ainult Mustojast.

Proovid ammutati pindmisest veekihi (~ 10-20 cm sügavuselt) eelnevalt soolhappes (0,1 M) steriliseeritud ning ultrapuhastas vees (ddH_2O) loputatud 1 l proovivõtupudelitesse. Ultrapuhas vesi loodi seadmega Millipore Elix 5 (USA), bakteritest vabanemiseks töödeldi vett veel Milli-Q Biopak-iga (USA). Enne proovivõtmist loputati pudelid alati kolm korda proovivõtupaiga veega. Kogutud proovid transporditi pimedas ning jahedas hoituna sama päeva jooksul laborisse, kus neid säilitati pimedas, temperatuuril $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Veeproovid filtreeriti 24 tunni jooksul peale kogumist.

Uurimisperioodi vältel koguti proovivõtukohtadesse paigaldatud temperatuuriandurite (HOBO 8K Pendant® Temperature Data Logger; Onset Computer Corporation, USA) abil kaks korda ööpäevas (kell 12:00 ja 00:00) veetemperatuuri andmed. Proovivõtupaikadesse M2 ja M3 paigaldati, tulenevalt nende lähedusest, üks temperatuuriandur.

2.2. Proovide filtreerimine

Proovide filtreerimiseks kasutati klaasfiiberfiltreid (KF) kinnipidamisvõimega (puudub ühtne poorsus) $\geq 0,7 \mu\text{m}$ (diameeter 47 mm; Whatman GE Healthcare, Saksamaa). Testimaks vaba ja lahustunud DNA püüdmise võimalikkust, viidi kuupäevadel 19.06 ja 08.08 kogutud proovide filtraadiga läbi lisa filtreerimine tselluloosnitraatfiltritega (TN, poori suurus $0,45 \mu\text{m}$, diameeter 47 mm; Whatman GE Healthcare, Saksamaa).

Lisaks tehasepoolsele steriliseerimisele põletati filtreid (500°C , 2 h) enne kasutamist, et välistada võimalik orgaaniline kontaminatsioon. Filtreeriti rõhkfiltrimisüsteemi abil, mis koosnes polüsulfoon kordvkasutatavatest pudelfiltritest (Polysulfone Reusable Bottle Top Filter, Thermo Fisher Scientific Nalgene™, USA) ja vaakumpumbast (alarõhk 0,3 - 0,4 bari; KNF N86 LABOPORT, USA).

Proovide filtreerimine viidi läbi juhuslikus järjekorras, et vältida võimalikke tehnilisi seaduspärasusi. Peale igat filtreerimist steriliseeriti kasutatud vahendid soolhappes (0,1 M) ja loputati ultrapuhhta veega. Proovid filtreeriti kogu mahus (1 l) või kuni filtri ummistumiseni. Peale filtreerimist keerati filtrid kokku, paigutati 2 ml steriilsetesse labori tuubidesse (Eppendorf, Saksamaa) ja säilitati kuni DNA eraldamiseni temperatuuril -80°C . Filtreerimine leidis aset laminaarkapis (Kojair KR-125, Soome), mille tööpind oli eelnevalt töödeldud (15 min) UV kiirgusega.

2.3. eDNA eraldamine

Sobivaima eDNA eraldamise protokoll valimiseks tilgutati KF filtritele PKD positiivsete noorjärkude basseinis „vannitamisel“ kasutatud vett. „Vannitamise“ käigus viidi kalad stressiseisundisse, et soodustada nendelt uriini eritamist, seega ka *T. bryosalmonae* eoste vabastamist. Testimistel kasutati kolme erinevat protokoll:

1. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit - Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)*;
2. Modifitseeritud *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit - Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)*. Lüüsimiseks kasutati RLT puhvrit (originaalis 1x PBS ja AL puhver);
3. Modifitseeritud Strand *et al.* (2014) protokoll (kirjeldatud järgnevalt).

Parimad tulemused saavutati 3. protokolliga, mis võeti kasutusele kogutud proovidest DNA eraldamisel.

Kääridega väikesteks tükkideks lõigatud filter pandi keeratava korgiga 15 ml Cellstar® Falcon tuubi (Greiner Bio-One, Austria), kuhu lisati 5 ml kuumutuskapis (Heraeus Function Line, Saksamaa) 65 °C eelsoojendatud CTAB puhvrit (20 g/l CTAB; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM Na₂ EDTA). Iga DNA eraldamise korra jaoks valmistati uus CTAB puhver. Rakkude lagunemise hõlbustamiseks lisati 50 µl proteinaas K ensüümi lahust (20 mg/ml) ja inkubeeriti 65 °C juures 90 min, iga 30 min järel tuubi segades (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc, USA). Pärast lüüsimist tsentrifuugiti proove 5 min (3800 x g; Sigma 4K15C, Saksamaa) ning supernatant (lahuse pealmine kiht) pipeteeriti uude tuubi. Seejärel lisati DNA-d sisaldava kihi eraldamiseks 3 ml kloroformi: isoamüülalkohol (24:1; Amresco, USA) ja segati kergelt enne 12 min tsentrifuugimist (3800 x g). Järgnevalt pipeteeriti kõige pealmine kiht uude tuubi (15 ml) ning asetati 5 minutiks -20 °C juurde. Seejärel lisati DNA sadestamiseks 0,7 x mahust (~ 1,4–2,9 ml) jääkülma isopropanooli ja loksutati paar korda isopropanooli täieliku segunemiseni. Järgnevalt inkubeeriti seda toatemperatuuril 25 min, ning asetati tsentrifuugi (20 min 3800 x g). Seejärel eemaldati supernatant ning DNA puhastati 500 µl 70 % ja 96 % etanooliga (mõlemal korral tsentrifuugiti proove 5 min jooksul 3800 x g). DNA pellet kuivatati 50 °C

juures 10-15 min või kuni pelleti kuivamiseni. Lõpetuseks lahustati kuivanud DNA 50 °C AE (10 mM Tris-Cl; 0,5 mM EDTA, pH 9,0) puhvris ning säilitati –20 °C juures.

Proovide filtreerimine ja DNA eraldamine viidi läbi TÜ tehnoloogiainstituudi laboris, eraldamise järgsed etapid EMÜ vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris.

2.4. qPCR

Proovides *T. bryosalmonae* arvukuse hindamiseks loodi qPCR standard, mis väljendab positiivse proovi tuvastamiseks kuluvat qPCR lävendtsükli (ingl. k. *threshold cycle* - C_t) suurust. Standard loodi nelja PKD positiivse meriforelli neeru koeproovist kokku segatud ja amplifitseeritud PCR-i produkti baasil. Amplifitseerimisel kasutati märklaudgeeniks SSU (ingl. k. *small subunit*) rDNA (ribosoomaalne DNA) 244 bp fragmenti, liigispetsiifilisteks praimeriteks 514F_new (5'-ATTCAGGTCCATTCGTGAGTAACAAGC-3') (Hartikainen *et al.* 2013) ja 776R (5'-GCTGATACACCCAATTAAGGGCAG-3') (Morris *et al.* 2002). Saadud PCR-i produkt puhastati (eemaldati ≥ 50 bp pikkused fragmendid) *Select-A-Size DNA Clean & Concentrator kit*-iga, vastavalt protokollile (Zymo Research, USA). Produkti kontsentratsioon mõõdeti fluoromeetriga (Qubit® 2.0, Thermo Fisher Scientific; Life Technologies, USA) ning lahjendati TE puhvris (Qiagen, Saksamaa) kontsentratsioonini 1 ng/μl ($0,5 \times 10^{-15}$ M). Saadud lahusest tehti standardkõvera jaoks 1:10 lahjendusseeriad ($n = 5$; $0,5 \times 10^{-19}$ M kuni 10^{-23} M). Standardkõver väljendab parasiidi arvukuse ja lävendtsükli vahelist seost.

Juhuvalimiga valitud proovidega (3 x TN + 3 x KF; samad proovivõtupaigad ja aeg) viidi läbi inhibitsiooni test (ingl. k. *internal positive control* – IPC), et tuvastada võimalik inhibiitorite olemasolu ja nende mõju suurus. Inhibitsiooni määra välja selgitamiseks lisati proovidele eelnevalt sünteetilist fragmenti (5'-GTATTCCTGGTTCTGTAGGTTGAGCGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACATGGTCATAGCTGTTTCCCGATACGGAAGTCCAGTCACAT -3') (97 bp; Microsynth AG, Šveits). IPC malli kontsentratsiooniks seati (Qubit® 2.0) 1 nM ja säilitati TE puhvris. Loodud standardist tehti 1:10 lahjendusseeriad ($n = 5$, $0,5 \times 10^{-19}$ M kuni 10^{-23}

M), mida kasutati qPCR-i läbiviimiseks koos praimeripaariga MIMf (5'-GTATTCCTGGTTCTGTAGGTTGAGC -3'), MIMr (5'-ATGTGACTGGACTTCCGTATCG -3'). Referentsiks kasutati ddH₂O, millele lisati samuti sünteetilist fragmenti. IPC-ga qPCR-i reaktsioon (18 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix; 11,2 µl dH₂O; 2 µl IPC standardit (0,5 x 10⁻¹⁹ M); 0,2 µM kumbagi praimerit. qPCR reaktsioonisegu ja DNA (2 µl) plaadile kandmiseks kasutati pipeteerimise robotit (QIAGEN QIAgility, Saksamaa). qPCR viidi läbi kuues korduses, kasutades järgmist temperatuuriprofiili:

- algne denaturatsioon 12 min 95 °C;
- 40 tsüklit: denaturatsioon 15 sek 95 °C, praimerite seondumine 30 sek 61 °C, praimerite ekstensioon/uute ahelate süntees 30 sek 72 °C;
- 40 tsüklit: sulamiskõver (15 sek 95 °C, 60 sek 60 °C, 30 sek 95 °C) ning
- jahustükkel 15 sek 60 °C.

Inhibitsiooni määra (%) arvutamiseks kasutati valemit:

$$100 - (((Ct - Ct_{H2O}) - x)^{10}) * 100), (1.1.)$$

kus;

Ct – proovi korduste keskmine Ct ;

Ct_{H2O} – ddH₂O proovi korduste keskmine Ct ;

x – inhibitsiooni kõvera kalle.

Lähtudes IPC tulemustest, puhastati klaasfiiberfiltrite proovid enne qPCR-i tegemist, kasutades QIAamp DNA Mini Kit-i ja QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit - DNA Purification from Tissues protokoll (alates punktist 5b).

T. bryosalmonae tuvastamiseks ja arvukuse hindamiseks töötati välja qPCR metoodika, mille parimate tulemuste saavutamiseks testiti erinevaid reaktsiooni komponente. Testiti 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) ja 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne) reaktsioonisegusid, millest paremad tulemused saavutati viimasega.

Sihtmärk DNA amplifitseerimiseks testiti kahte praimeripaari: 166 bp PKD-realF (5'-TGTCGATTGGACACTGCATG-3'), PKD-realR (5'-ACGTCCGCAAACCTTACAGCT-3') (Grabner & El-Matbouli 2009) ja 182 bp 518F_Q (5'-CAGGTCCATTCGTGAGTAACAA-3'), 680R_Q (5'-TGCCTCCTTAGTTAGGTAGACAAA-3') (Sigma-Aldrich®, Suurbritannia). Suurem tundlikkus saavutati pikema, 182 bp *SSU* rRNA märklaudgeeni amplifitseeriva praimeripaariga. *SSU* rRNA geen paikneb parasiidi genoomis tandemkordusena, mis loob, võrreldes ühekordsete geenikoopiatega, tuvastamisel suurema tundlikkuse (Fontes *et al.* 2017).

Iga qPCR reaktsioon (20 µl) koosnes 2 µl DNA-st ja 18 µl reagendisegust: 4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix; 13,2 µl dH₂O; 0,2 µM 514F_Q ja 0,2 µM 776R_Q praimerit. Kuna reagendisegu sisaldas valgustundlikke elemente, pipeteeriti see 2 ml läbipaistmatutesse tuubidesse (Starlab, Saksamaa). Reagendisegu ja DNA kokku segamiseks ning qPCR plaadile (96 x 0,2 ml; QIAGEN, Saksamaa) laiali jagamiseks, kasutati pipeteerimise robotit, mida enne kasutamist töödeldi 15 min UV-ga. Iga qPCR jooksis sisaldas kolmes korduses: negatiivseid kontrole, uuritavaid proove ja viite qPCR standardit ($0,5 \times 10^{-19}$ M kuni 10^{-23} M). Kõik töös läbi viidud qPCR reaktsioonid teostati seadmega 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), tulemused analüüsiti tarkvaraga 7500 Software version 2.0.4 (Applied Biosystems, USA). DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist temperatuuriprofiili: 15 min 95 °C (algne denaturatsioon); 45 tsüklit: 15 sek 95 °C (denaturatsioon), 15 sek 61 °C (praimerite seondumine), 40 sek 72 °C (praimerite ekstensioon/uute ahelate süntees). Iga qPCR analüüs lõppes sulamiskõvera analüüsiga (15 sek 95 °C, 60 sek 60 °C, 30 sek 95 °C) ning jahustsükliga (60 °C 15 sek). Sulamiskõvera analüüs on vajalik, et veenduda kas amplifitseeritud DNA oli soovitud märklaudgeen.

2.5. Statistiline analüüs

Peale esmast analüüsi (7500 Software version 2.0.4) viidi läbi täiendav analüüs programmiga Real-time PCR miner (Zhao & Fernland 2005). Real-time PCR miner arvutab lävendtsükli väärtuse iga PCR reaktsiooni kineetika järgi eraldi.

Programmi poolt kasutatavad algoritmid tagavad meetodi objektiivsuse ja kvaliteetsemad tulemused, mis on sõltumatud PCR-i läbiviimiseks kasutatud tehnikast. PCR minerit kasutades puudus vajadus määramispiiri seadmiseks, kuna selle abil sai kinnitust kas amplifitseeritud DNA oli tõepoolest sihtmärk DNA (esines korrektne eksponentsiaalne faas).

Lisaks kalibreeriti PCR mineri väärtused iga analüüsi standardkõvera järgi, et ühtlustada nendevahelisi võimalikke tehnilisi erinevusi. Iga qPCR plaadi kohta arvutati selle standardkõvera baasil reaktsiooni efektiivsus (e):

$$10^{\left(\frac{-1}{-1*s}\right)}, (1.2.)$$

kus;

s – standardkõvera kalle.

Reaktsiooni efektiivsuse põhjal korregeeriti lävendtsükli väärtused valemiga:

$$\log_2(e^{Ct}). (1.3.)$$

Lävendtsükli väärtus suurenes kui efektiivsus oli üle kahe, kui väiksem, siis aga kahanes. Kuna lävendtsükli suurenedes kahaneb tuvastatud DNA kogus, ning et analüüsi saaks kaasata proove kus parasiiti ei tuvastatud, kasutati andmeanalüüsis ka lävendtsükli pöördväärtuseid:

$$1/Ct, (1.4.)$$

negatiivsetele proovidele omistati väärtuseks 0. Lävendtsükli pöördväärtuseid kasutati juhtudel, kus analüüsi oli oluline kaasta ka negatiivsete tulemustega proove.

Andmeanalüüs viidi programmidega R-Statistic (versioon 3.4.4; www.r-project.org) ja MS Excel. Analüüsis kasutati temperatuuriandmetena kolme näidu (proovivõtu kuupäeva ja sellele eelnenud päeva keskpäevane, kahe päeva vaheline kesköine) keskmist veetemperatuuri. Kolme näidu keskmine temperatuur valiti arvestades eoste lühikest eluiga ja kannet veevooluga ning vahetult proovivõtule eelnenud veetemperatuuri võimalikku mõju eoste vabastamisele sammalloomadelt.

Tehniliste probleemide tõttu kasutati mõlema jõe puhul paisudest allavoolu jäävate lõikude temperatuuriks vastavalt proovivõtupunktide A2 ja M2/M3 andmeid. Kuna aga proovivõtupunktide M2/M3 ja M4 vaheliste temperatuuride erinevus oli proovivõtuperioodil minimaalne ($\sim 0,1^{\circ}\text{C}$), ja eeldades sarnast mustrit ka Altja jõe puhul, on selle mõju lõpptulemustele marginaalne.

Proov loeti positiivseks kui vähemalt kahes selle koopias toimus korrektne amplifitseerimine. Metoodika usaldusväärsuse selgitamiseks arvutati positiivsete proovide koopiade C_t väärtustest standardhälve (ingl. k. *standard deviation* – SD). Väiksem SD näitab koopiade suuremat sarnasust ning viitab metoodika suuremale stabiilsusele. Proovi koopiade C_t väärtuste vaheline SD arvutati vaid kolme positiivse koopia olemasolul, mistõttu SD analüüsides ei kasutatud kõiki positiivseid proove.

3. TULEMUSED

3.1. Analüüsi taustinfo

Iga qPCR analüüsiga loodi uus lineaarne standardkõver, mille keskmine kalle oli -3,27, korrelatsiooni koefitsient (R^2) 0,987 ja amplifitseerimise efektiivsus 102,5 %. Efektiivsus üle 100 % tuleneb tõenäoliselt inhibitsiooni olemasolust, mis on suuremate lahjenduste juures väiksem ning kajastub seetõttu suurema efektiivsusena. Standardkõverate loomisel ei toimunud mitte kõigi suurima lahjendusega ($0,5 \times 10^{-23}$) standardi koopiade amplifitseerimine, lisaks suurenes neis ka hajuvus.

Positiivse tulemuse määramiseks toimus veel lisakontroll, kus võrreldi standardite sulamiskõveraid amplifitseeritud koopiade sulamiskõveratega. Sulamiskõveratel esines kaks tippu, millest esimene, temperatuuril $\sim 62^\circ\text{C}$, tulenes *primer dimer*-i (PD) olemasolust. PD on PCR kaasprodukt, kus praimerid hüpoteetiliselt omavahel ja mille tulemusel DNA polümeraas amplifitseerib PD-it. PD-i olemasolu võib mõjutada sihtmärki DNA täpset amplifitseerimist ja lõpptulemusi, kuna tekib konkurents reaktsioonikomponentide üle. Teine tipp, temperatuuril $\sim 85,5^\circ\text{C}$, viitas sihtmärki DNA amplifitseerimisele. Koopia loeti positiivseks, kui amplifitseerimisel tekkis ainult teine tipp. NTC-id ja negatiivsed proovid tekitasid esimese tipu, viimastel võisid seejuures esineda ka mõlemad tipud.

Peale PCR mineri tulemuste korrigeerimist vastavalt iga plaadi efektiivsusele, tõusis lävendtsükli keskmine väärtus, võrreldes algväärtustega (7500 Software version 2.0.4), märkimisväärselt. Lävendtsükli väärtuste keskmine tõus oli vastavalt Altja jõe proovidel 4, Mustoja proovidel 1,4.

Proovidega läbi viidud inhibitsiooni test näitas keskmiseks inhibitsioonimääraks TN filtrite puhul 7 %, KF filtritel koguni 77 %. Peale viimaste puhastamist vähenes antud näitaja keskmiselt 44 %-le.

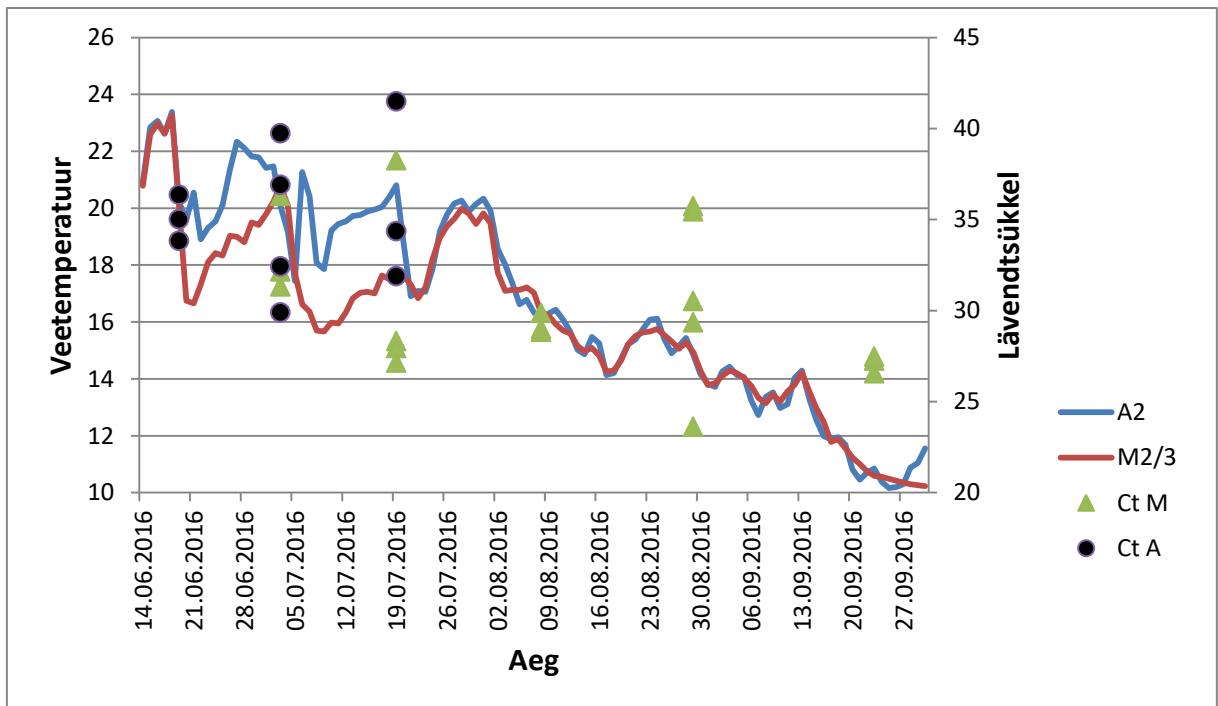
Veekogudevahelises veetemperatuuride võrdluses kasutati andmeid kuni 23.09.2016 proovivõtukuupäevani. Arvestades sammalloomade ja *T. bryosalmonae* bioloogiat, on talvised veetemperatuurid väheolulised ja ei ole haiguse üldise dünaamika kirjeldamisel kuigi informatiivsed. Nimetatud proovivõtuperioodi vältel ei esinenud veekogudevahelistes veetemperatuurides olulisi erinevusi ei ülalpool paise ega ka paisualustel jõelõikudel. Veekogude siseselt olid võrreldes ülemjooksuga märgatavalt soojema veetemperatuuriga paisualused lõigud. Mustoja paisualune keskmine veetemperatuur oli ülemjooksust 1,2 °C ($p < 0,001$) soojem, Altja jões koguni 2,6 °C ($p < 0,001$).

3.2. Klaasfiiberfiltrite tulemused

Klaasfiiberfiltrite analüüsis osales 195 proovi (sh. 39 *NTC*), millest *T. bryosalmonae* tuvastati 30-s, sh. ka ühes negatiivses kontroll-proovis. Positiivse tulemusega *NTC*-le tehti kordusamplifitseerimine, mis osutus samuti positiivseks. Kontamineeritud *NTC*-ga samas qPCR analüüsis (samal plaadil asetsenud) osalenud proovidega viidi läbi uus amplifitseerimine, mis aga ei muutnud nende tulemusi. Seejuures olid korrektsed ka analüüsides negatiivsed kontrollid. See tähendab, et kontaminatsioon leidis aset vaid *NTC*-s, mitte kogu analüüsis, ja samal qPCR plaadil olnud proovide analüüsist välja jätmine ei olnud tarvilik.

Jõgede vahel ei esinenud märkimisväärset erinevust positiivse proovi tuvastamise tõenäosuses (Fisher's Exact Test for Count Data: odds ratio = 1,764, $p = 0,279$). Antud võrdlus viidi läbi ilma proovivõtukuupäeva 23.09 andmeteta, kuna sellel päeval koguti proovid ainult Mustojast.

Veekogude lõikes esinesid Mustojas oluliselt väiksemad läventsükli väärtused kui Altja jões (Welch Two Sample t-test: $t = -3,343$; $df = 19,743$; $p = 0,003$), keskmiste väärtustega vastavalt 30,3 ja 35,2 (joonis 9). Lisaks olid Altja jões 5 positiivset proovi 10-st kahe positiivse koopiaga, Mustojas seevastu 19-st vaid 1.



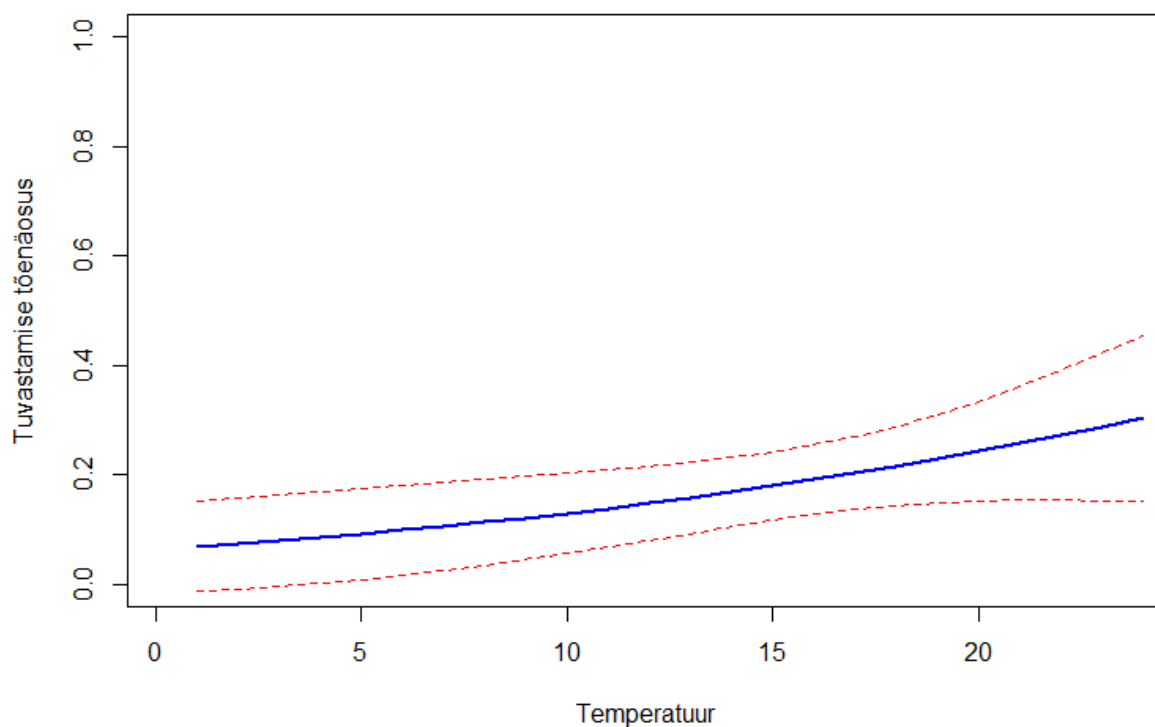
Joonis 9. Positiivsete proovide lävendtsükklite väärtused ajateljel koos proovivõtuperioodi veetemperatuuridega. Tulenevalt novembri kuu positiivse proovi erandlikkusest ei ole seda joonisel kajastatud

Mõnevõrra üllatuslikult tuvastati *T. bryosalmonae* esinemine mõlemas jões ka ülalpool paise ning parasiidi esinemine novembris (tabel 3). Ainuke proovivõtukoht kus parasiidi esinemine ei leidnud kinnitust oli Altja jõel punkt A2. Oodatult tuvastati kõige rohkem positiivseid proove alamjooksu proovivõtpunktidest A4 ($n = 6$) ja M4 ($n = 15$). Võrreldes ülejäänud proovivõtpunktidega oli alamjooksul positiivse proovi tuvastamine Mustojas 91 %, Altja jões 78 % tõenäolisem.

Tabel 3. KF tulemused proovivõtukohtade ja kuupäevade kaupa. Kahe positiivse koopiaga proovid on tähistatud „*“

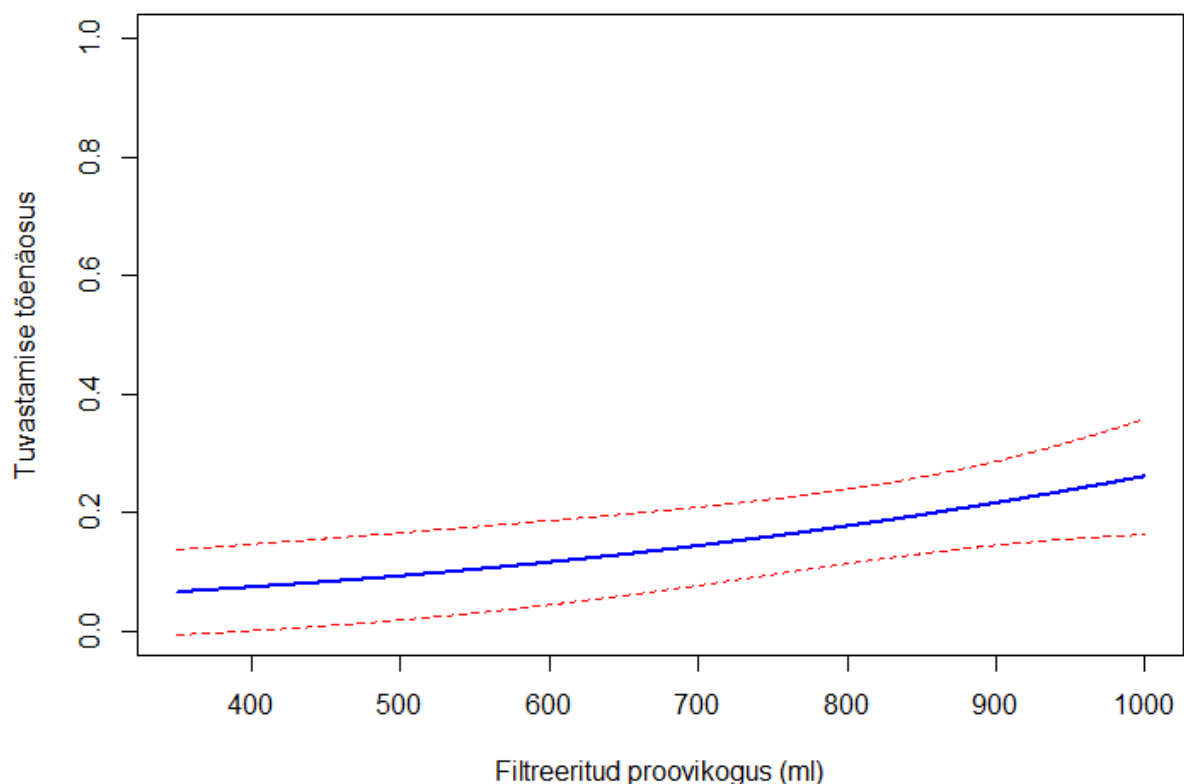
	A1	A2	A3	A4	M1	M2	M3	M4	Kokku
19.06	0	0	1*	2	0	0	0	0	3
03.07	1*	0	1	2*	0	0	1	2	7
19.07	0	0	1	2**	0	1*	0	3	7
08.08	0	0	0	0	0	0	0	3	3
29.08	0	0	0	0	1	0	1	3	5
23.09	-	-	-	-	0	0	0	3	3
09.11	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Kokku	1	0	3	6	1	1	2	15	29

Veetemperatuuri rolli positiivse proovi tuvastamise tõenäosusele hinnati logistilise regressioonianalüüsiga, millega ei tuvastatud statistiliselt tugevat seost ($\exp = 0,077$; $p = 0,056$). Bioloogiline seos võib sellegi poolest esineda (joonis 10). Veetemperatuuri mõju lävendtsükli väärtusele hinnati lineaarse regresioonianalüüsiga. Tulemustest ilmnes veetemperatuuri ja lävendtsükli pöördväärtuse vaheline statistiliselt oluline positiivne seos ($\text{Adjusted } R^2 = 0,389$; $p = 0,035$), mis tähendab, et kõrgemate veetemperatuuride korral tõusis ka proovidest tuvastatud parasiidi DNA kogus.



Joonis 10. Tuvastamise tõenäosuse sõltuvus veetemperatuurist koos 95 % usalduspiiridega

Filtreeritud mahu mõju *T. bryosalmonae* tuvastamise tõenäosusele testiti logistilise regressioonianalüüsiga, millega tuvastati selle oluline positiivne mõju ($\exp = 0,003$; $p = 0,008$). Iga lisanduv 1 ml proovikogust tõstis positiivse proovi tuvastamise tõenäosust ~ 0,3 % (joonis 11). Lineaarse regressioonianalüüsiga tuvastati samuti positiivne seos ($\text{Adjusted } R^2 = 0,036$; $p = 0,010$) filtreeritud proovi mahu ja lävendtsükli pöördväärtuse vahel.

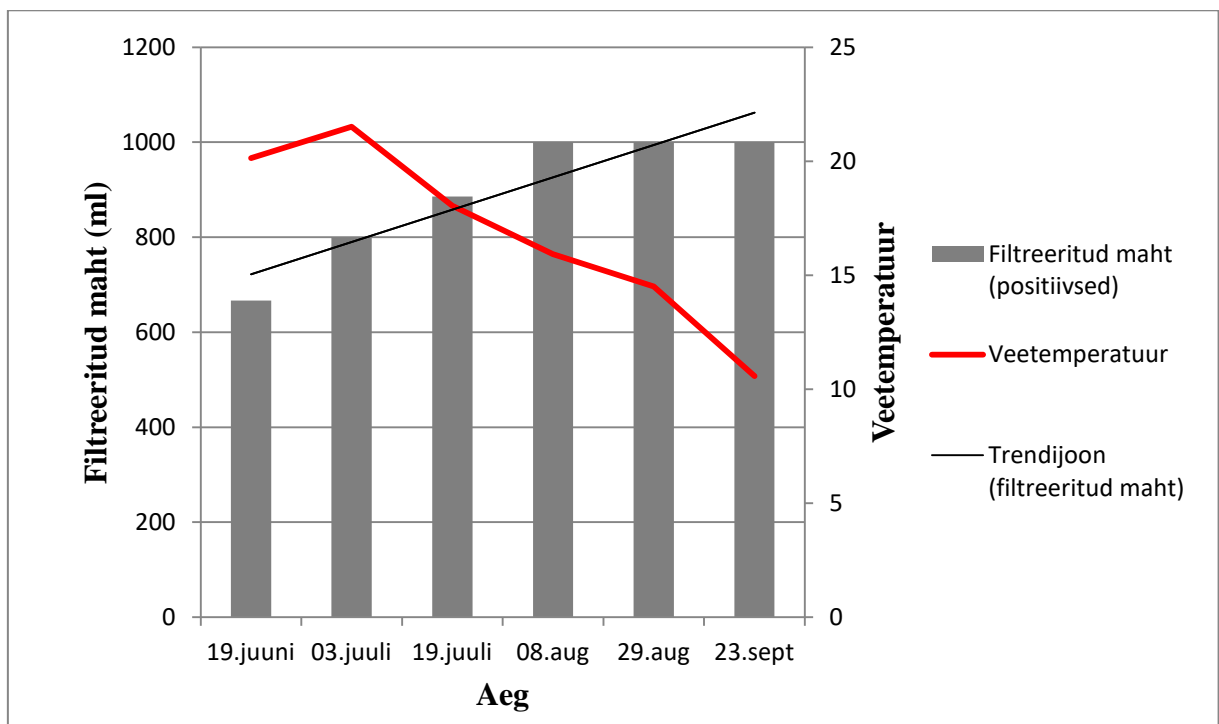


Joonis 11. Tuvastamise tõenäosuse sõltuvus filtreeritud mahust koos 95 % usalduspiiridega

Positiivsete proovide lävendtsüklike standardhälve oli vahemikus 0,06 – 1,483, mediaaniga 0,18. Vaid kahe positiivse proovi standardhälve oli teistest märkimisväärselt kõrgem. Lävendtsükli suuruse ja standardhälbe vahelise võimaliku seose hindamiseks kasutati lineaarset regressioonanalüüsi, millega ilmnis parameetrite vaheline tugev positiivne seos ($\text{Adjusted } R^2 = 0,445$; $p < 0,001$). Standardhälbe suurenemine lävendtsükli väärtuse kasvamisel viitab meetoodika suuremale usaldusväärsusele *T. bryosalmonae* kõrgema arvukuse korral (suurema parasiidi DNA koguse korral).

Lineaarse regressioonanalüüsiga ei tuvastatud standardhälbe seost veetemperatuuri (Adjusted $R^2 = -0,046$; $p = 0,870$) ega filtreeritud proovikogusega (Adjusted $R^2 = -0,044$; $p = 0,797$).

Lineaarse regressioonanalüüsiga ilmnas negatiivne seos veetemperatuuri ja filtreeritud mahu vahel (Adjusted $R^2 = 0,065$; $p < 0,001$). Seejuures ei näidanud keskmine filtreeritud maht ajaliselt olulisi trende ning suuri kõikumisi. Küll aga tõusis ajas positiivsete proovide filtreeritud maht (joonis 12). Alates 08.08.2016 tuvastati *T. bryosalmonae* ainult proovidest, mis filtreeriti täies mahus (1 l).



Joonis 12. Positiivsete proovide filtreeritud mahu muutus ajas (lineaarne regressioonivõrrand: Adjusted $R^2 = 0,015$, $p = 0,083$) koos proovivõtukuupäevade keskmiste veetemperatuuridega (Altja jõe ja Mustoja keskmine). Tulenevalt novembri kuu erandlikkusest ja väga madalatest veetemperatuuridest ei ole seda kajastatud ka joonisel

Altja jões oli keskmine filtreeritud maht märkimisväärselt väiksem kui Mustojas (Wilcoxon rank sum test with continuity correction: $W = 283,5$; $p < 0,001$). Mustoja

keskmiseks filtreeritud mahuks oli 950 ml (positiivsetel 975 ml), Altja jões 590 ml (positiivsetel 725 ml). Proovivõtukohtade lõikes Mustojas suuri erinevusi ei esinenud, Altja jões filtreeritud maht aga allavoolu hoopis kasvas (tabel 4).

Tabel 4. Keskmised filtreeritud mahud proovivõetupunktide kaupa

Proovivõetupaik	Filtreeritud maht (ml) Altja jõgi	Filtreeritud maht (ml) Mustoja
1	420	950
2	460	936
3	540	943
4	740	930

3.3. Tselluloosnitraat- ja klaasfiiberfiltrite võrdlus

Tselluloosnitraat- ja klaasfiiberfiltrite (edaspidi vastavalt TN ja KF) omavaheliseks võrdluseks kasutati kokku 96 proovi (TN – 48, KF – 48). *T. bryosalmonae* tuvastati kokku 9 proovist, neist 3 TN filtrit ja 6 KF filtrit. Seejuures ei leidunud ühtegi proovi, kus positiivne proov oleks tuvastatud paralleelselt nii TN filtritega kui ka KF filtritega. Antud tulemus viitab küll vaba DNA analüüsimise võimalikkusele, kuid väga väikeste koguste tõttu on selle tuvastamine keeruline ja usaldusväärsus pigem väikene. Oodatult tuvastati KF filtritega tunduvalt väiksemad lävendtsükli väärtused (tabel 5). Kuna üheski TN filtri proovis ei leidunud kolme positiivset koopiat ei olnud võimalik arvutada nende standardhälvet ja võrrelda neid KF filtrite filtratsiooni tulemustega. Viies KF filtri proovis olid positiivsed kõik kolm koopiat (keskmine $SD = 0,204$).

Tabel 5. Koondtabel tselluloosnitraat- ja klaasfiiberfiltrite proovide tulemustega

Filter	Positiivsete proovide arv	Keskmine lävendtsükkel	Lävendtsükli <i>SD</i>	Filtreeritud maht (ml)
TN	3	36,7	-	555
KF	6	32,2	0,2	715

Filtritevahelised erinevused ilmneseid ka proovide filtreerimise käigus, kus filtrite ummistumine toimus enamasti enne kogu mahu filtreerimist. KF filtrist ummistusid 40 filtrit 48-st, keskmise filtratsiooniga 715 ml. TN filtritega ummistusid, peale KF filtrite järgset filtreerimist, 45 filtrit 48-st, keskmise filtratsiooniga 555 ml (22 % vähem). Keskmiselt kulus KF filtritega filtreerimiseks aega 5-10 minutit, seejuures oli Mustoja proovide filtreerimine Altja jõe omadest kiirem. TN filtritega kulus Altja jõe proovide filtreerimiseks 20-30 minutit, Mustoja proovidel 15-20 minutit.

4. ARUTELU

Käesolevas töös kasutatud metoodika PKD haigustekitaja tuvastamiseks osutus üldjoontes sobivaks, kuid samas tõi välja mitmeid olulisi aspekte, mis võivad mõjutada selle rakendamise edukust. Töös hinnati proovivõtukohta, erinevate filtritüüpide, veetemperatuuri ja filtreeritud mahu mõju *T. bryosalmonae* tuvastamisele. Kahe erineva filtritüübi võrdlusest ilmnis metoodika suurem efektiivsus ja usaldusväärsus klaasfiiberfiltritega (KF), mille kasutamine, erinevalt tselluloosnitraatfiltritest (TN), oli orienteeritud *T. bryosalmonae* eoste tuvastamisele. Parasiidi tuvastamist soodustasid veel ka kõrgem veetemperatuur ja suurem filtreeritud proovimaht. Mõlemas uuritud jões suurenes *T. bryosalmonae* tuvastamise tõenäosus märkimisväärselt nende alamjooksu proovivõtupunktides.

TN filtrite kasutamise eesmärk oli *T. bryosalmonae*-lt vabanenud rakuvälise DNA püüdmise võimalikkusse välja selgitamine. Enne filtreerimist TN filtritega toimus eelfiltreerimine, mistõttu oli välistatud nendega eoste või statoblastide tabamine. Kuna tõenäoliselt pidas juba KF filter osa vabast DNA-st kinni, ei ole TN filtrite tulemused ilmselt vastavuses nende reaalse võimekusega rakuvälise DNA püüdmisel. Seetõttu on seletatav suhteliselt väikene tuvastatud positiivsete proovide arv. Samas ilma eelfiltreerimiseta oleksid TN filtrid tõenäoliselt ummistunud väga kiiresti ja filtreeritud kogus oleks olnud väiksemgi, mis oleks vähendanud parasiidi tuvastamise tõenäosust.

TN filtrite vaba DNA püüdmisele viitab tõsiasi, et üheski proovis ei tuvastatud mõlema filtritüübiga samaaegselt *T. bryosalmonae* esinemine. Sellest võib järeldada, et KF filtrid ei olnud siiski kuigi efektiivsed püüdmaks vaba DNA-d ning nende positiivsed tulemused tulenesid eoste (või ka statoblastide) olemasolust. Seetõttu on mõistetavad ka KF filtrite madalamad lävendtsükli väärtused (suurem sihtmärk DNA kogus). KF filtrite sobilikkust eoste tabamiseks kinnitavad ka uuringud, kus kasutati vähikatku tekitaja *Aphanomyces astaci* eoste püüdmiseks 2 µm kinnipidamisvõimega KF filtreid (Wittwer *et al.* 2018).

TN filtrite positiivsete tulemuste puhul on tähelepanuväärsed nende proovivõtupunktid (vahetult peale paise - M3 ja A2), mis KF filtrite puhul olid ebaefektiivsed. KF filtritega ei tuvastatud proovivõtupunktist A2 ühtegi positiivset proovi, M3-s oli neid vaid kaks. Seega võib tulemuste põhjal järeldada, et *T. bryosalmonae* eoste paisu ületamine on minimaalne ja suur osa neist võib paisu settida. Antud teooriale pakub toetust ka see, et eosed, erinevalt enamiku sammallooma liikide statoblastidest, ei ole ujuvad (Okamura *et al.* 2011). Vahetult peale paisu või paisu ülevoolust KF filtritega tuvastatud positiivsed proovid ($n = 3$) võisid pärineda paisu konstruktsioonidel elutsevatest sammalloomadest vabastatud eostest, statoblastidest või oli tegemist rakuvälise DNA-ga. Kuigi paistab, et paisud jõel ei panusta läbi eoste otseselt haiguse levikusse, parendavad need siiski sammalloomade elutingimusi paisust allavoolu jäävatel lõikudel. Suuremad ja paremas konditsioonis sammalloomakolooniad pakuvad seeläbi laiemat kasvupinda ka *T. bryosalmonae*-le.

Üldiselt arvatakse, et kõrgemad veetemperatuurid mõjuvad *T. bryosalmonae* elutegevusele soodsalt, mistõttu võiks eeldada ka nende lihtsamat tuvastamist. Antud töö valimi põhjal oli veetemperatuuril positiivne mõju märklaudgeeni kogusele proovis. Veetemperatuuri roll positiivse proovi tuvastamise tõenäosusele ei olnud küll statistiliselt oluline, kuid väga lähedal sellele. Seetõttu võib teatud mõõndustega siiski väita, et veetemperatuuril oli positiivne mõju *T. bryosalmonae* tuvastamisele. Temperatuuri tõusuga 1 °C suurenes parasiidi tuvastamise tõenäosus ~ 8 %.

eDNA meetodika puhul tuleb aga arvestada, et koos veetemperatuuriga võivad suurened ka sihtmärk DNA tuvastamist pärssivad tegurid. Üheks selliseks on filtreeritud proovi mahu vähenemine kõrgematel veetemperatuuridel. Kui analüüsi kaasata vaid positiivsed tulemused, vähenesid veetemperatuuri alanedes ka lävendtsükli väärtused, ehk proovist tuvastati suurem kogus sihtmärk DNA-d. Kirjanduse põhjal on teada, et kõrgemate veetemperatuuride juures kiireneb DNA ja ka muu orgaanika ensümaatiline ning mikroobne lagunemine (Zhu 2006). Arvestades, et *T. bryosalmonae* eos on lühiealine ja suhteliselt õrn (de Kinkelin *et al.* 2002), võivad need olla eriti vastuvõtlikud kõrgetele veetemperatuuridele ja päikesekiirgusele. Varjumine päikesekiirguse eest võibki ühe tegurina, lisaks kalade paiknemisele veesambas, seletada eoste ujuvuse puuduvust.

Samuti esines uuringus osalenud veekogudes väga suur inhibitsioon, mille mõju tuvastamise efektiivsusele võis olla märkimisväärne, seda eriti madala sihtmärk DNA koguse juures. Alates proovivõttuupäevast 08.08.2016 olid kõik Altja jõe proovid

negatiivsed, Mustojas tuvastati *T. bryosalmonae* vaid proovidest, mis filtreeriti täies mahus. Antud aspekt viitab tõenäoliselt veekeskkonnas aset leidnud muutustele. On ebatõenäoline, et nimetatud kuupäevast parasiiti Altja jões enam ei esinenud, pigem hakkasid prevaleerima tegurid, mis pärssisid nende veeproovidest tuvastamist. Altja jões olid lävendtsükli väärtused suhtelised kõrged, samuti olid pooled selle positiivsed proovid kahe positiivse koopiaga, mistõttu võib eeldada selle tulemuste suuremat vastuvõtlikkust erinevate negatiivsete mõjurite suhtes. Seejuures püsis filtreeritud maht proovivõtuperioodi vältel suhteliselt sarnane, mistõttu ei olnud tõenäoliselt tegemist sestoni sisalduse suurenemisest tingitud negatiivse mõjuga. Ka veetemperatuurid olid madalamad, kui proovivõtukordadel mil sihtmärk DNA tuvastati, ehk ilmselt ei olnud tegemist bakteriaalse või ensümaatilise lagunemise intensiivistumisega. Võimaliku variandina võis siinkohal tegmist olla inhibitsiooni mõju suurenemisega proovivõtuperioodi vältel.

Inhibiitorite mõju eDNA metoodika puhul on mitmetahuline, esiteks võivad need takistada sihtmärk DNA kättesaadavust, teiseks võivad need pärssida qPCR-i erinevaid komponente, näiteks seondudes polümeraasiga või blokeerides vajalikke reagente (Opel *et al.* 2010). Kuigi uuringus osalenud jõgede kohta puuduvad hüdrokeemilised andmed, on nende tumedaveelisuse ja valgaldel paiknevate märgalade tõttu alust arvata, et suure inhibitsiooni põhjustajaks on kõrge humiinainete sisaldus. Humiinhapped seonduvad sihtmärk DNA-ga, takistades selle kättesaadavust amplifitseerimisel. Inhibitsiooni mõju ulatus sõltub analüüsimisel kasutatavatest vahenditest, näiteks on selle mõju üldiselt väiksem kõrgematel temperatuuridel töötavatele praimeritele (Opel *et al.* 2010). Samuti tõuseb amplifitseerimise efektiivsus ning väheneb inhibitsiooni mõju, kui kasutada lühemaid märklaugeene (Opel *et al.* 2010). Antud töös testiti kahte praimeripaari, millest paremad tulemused saavutati pikemat märklaugeeni amplifitseerivate praimeritega. Küll aga tuleb arvestada, et praimeritevahelises võrdluses ei kasutatud uuringu veekogude vett, mis võinuks lõpptulemusi muuta.

Kuigi humiainained talitlevad amplifitseerimisel inhibiitoritena, võivad need keskkonnas peale DNA-ga seondumist, takistada selle ensümaatilist lagunemist (Eichmiller *et al.* 2016). Seega tasuks testida erinevaid metoodilisi lahendusi, mille efektiivsus oleks inhibiitoritest vähem mõjutatud ja mis oleksid võimelised DNA pikema säilimise enda kasuks pöörama. Eichmiller *et al.* (2016) rõhutavad, et proovide hoiustamise ja kogumise protokollide loomisel peaks arvestama eDNA kiire lagunemise ning temperatuuri ja vee parameetrite (pH, troofsus, mikroobne aktiivsus) mõjudega. Kuigi antud töös oli

rõhuasetus *T. bryosalmonae* eoste, mitte vaba DNA püüdmisel, peab meeles pidama nende lühiealisust ning haprust, seega suuremat vastuvõtlikkust erinevate keskkonnategurite suhtes. Arvestades, et töös kasutatud proovid filtreeriti nende kogumise järgsel päeval, võib üks lahendus paremate tulemuste saavutamiseks olla proovide kohene filtreerimine peale nende kogumist.

Lisaks võimalikele keskkonnateguritele, mis pärsvad sihtmärk DNA tuvastamist, tuleb arvestada ka nende võimalike mõjudega *T. bryosalmonae* ja sammalloomade elutegevusele. Proovivõtuperioodil esines väga kõrgeid veetemperatuure (juunis, juulis), mis võisid sammalloomadele põhjustada stressi või kaasa tuua isegi suremuse tõusu (Tops *et al.* 2009). *T. bryosalmonae* areng on aga sõltuv peremehe konditsioonist, kui sammalloom on stressis esineb neil nakkuse varjatud faas, mille käigus aga eoseid ei vabastata (McGurk *et al.* 2005). Ainuke proovivõtukord kui Mustojas parasiiti ei tuvastatud oli 19.06.2016, millele olid eelnenud äärmiselt kõrged veetemperatuurid ($> +23^{\circ}\text{C}$). Samamoodi võisid sammalloomades stressi põhjustada peale veetemperatuuri piike aset leidnud järsud veetemperatuuri langused. Proovivõtukuupäeval 03.07.2016 alanud väga tugevad vihmasajud langetasid märkimisväärselt uuritavate veekogude veetemperatuure ning tõstsid kiiresti piirkonnas paiknevate jõgede veetaset (Riigi Ilmateenistus). Selliste ekstreemsete ilmapuutuste puhul talitlevad paisud puhvritena, omades suure veemahu tõttu inertsit ja pakkudes sammalloomadele stabiilsemaid elutingimusi.

Jõgedesiseselt ilmnes selgelt, et paisud annavad olulise panuse veetemperatuuri tõusu, seda eriti Altja jõe puhul. Kuigi Mustojal paikneb kaks paisu, mille kogupindala on suurem (eksponeeritus päikesele) kui Altja jõe paisul, oli viimase mõju veetemperatuurile ilmekam. Siinkohal tuleb ilmselt mängu Altja jõe äärmiselt tume vesi, mis on päikesekiirgusele eriti vastuvõtlik. Antud hüpoteesi toetab ka joonis 9, millel on näha Altja jõe väga järsud veetemperatuuri tõusud.

Novembri kuus väga madalal veetemperatuuril tuvastatud positiivne proov on võimalik seletada kaheti. Esimene võimalus on, et proovi sattus *T. bryosalmonae*-ga nakatunud sammallooma statoblast, mida sammalloomad kasutavad raskete keskkonnatingimuste üleelamiseks. Statoblasti kasuks räägivad sellel momendil valitsenud talvised tingimused (veetemperatuur $2,5^{\circ}\text{C}$). Teine võimalus on, et proovi sattus kalast vabanenud eos, mis võis pärineda nakatunud noorjärgult või haiguse üleelanud täiskasvanud isendilt. Abd-

Elfattah *et al.* (2014) on tõestanud, et täiskasvanud kalades, kes on nakkuse üleelanud, võivad eosed moodustuda veel pika aja vältel (sh. ka talvel). 23.09.2016 läbi viidud katsepüükide käigus tabati ka juba jõkke saabunud suguküpsed kudekalu, suurendades veelgi võimalust, et eos (või eosed) võis pärineda PKD suhtes resistentset kalalt.

Jõgede vahel ei esinenud küll märkimisväärseid erinevusi positiivsete proovide tuvastamises, kuid tuleb arvestada, et Mustojas oli paisust allavoolu vaid üks proovivõtukoht, mis ei paiknenud vahetult peale paise. Altja jões oli neid seevastu kaks. Tulemustest ilmnes, et vahetult peale paise ei ole märgata *T. bryosalmonae* DNA suurenenud tabamist, mistõttu on parasiidi tuvastamine liikudes paisudest allavoolu oluliselt tõenäolisem. Eeldades, et eosed paise ei ületa, suureneb seetõttu jõe ristlõiget läbivate eoste arv mida rohkem paisust allavoolu liikuda, kuna suureneb ka sammalloomade kasvupind. Võib eeldada, et lisaks sammalloomadele panustasid alamjooksudel positiivsete proovide tuvastamisse ka kaladelt pärinevad eosed. Altja jõe puhul tuleb veel arvestada, et filtreeritud proovikogus liikudes allavoolu kasvas ja uurimusest järeldus filtreeritud mahu positiivne seos nii tuvastamise tõenäosusele kui ka märklaudgeeni kogusele. Tulenevalt proovivõtukohtade valikust võis seetõttu Altja jões parasiidi tuvastamine olla soodustatum.

Võrreldes ülejäänud Altja jõe proovivõtupunktidega anomaalselt suure filtreeritud proovikoguse kasvu seletamiseks jõe alamjooksul, tuleks läbi viia vee keemiline analüüs. Proovivõtupunkti A4 hüppeline filtreeritud mahu tõusu võis aga olla põhjustatud proovivõtupunkti varjatusest päikesele (metsas) ja aeglasemast veevoolust (sügavam lõik). Päikesele varjatuse tõttu oli proovivõtupunktis ja sellele eelnenud jõelõigul planktoni ning sestoni tekkimine pärsitud, aeglasem veevool tagas osakeste settimise või vähemalt laskumise sügavamasse veekihti, proov aga koguti pindmisest veekihist. Kuna ka *T. bryosalmonae* eosed ei ole ujuvad, võis see mõjutada antud proovivõtukohest positiivse tulemuse tuvastamist ja tegelik parasiidi DNA kogus antud jõelõigus võis olla suurem. Arvestades, et alamjooksu proovivõtupunktid panustasid positiivsete proovide arvu enim, võis see suurel määral mõjutada kogu jõe tulemust. Antud hüpoteetilise järelduse baasil ilmneb, et jäigalt paika pandud meetodika ei pruugi alati olla kõige parem lahendus ja võib tekkida vajadus kohandada proovivõtumetoodikat vastavalt situatsioonile.

Uurimusest selgus väga tugev positiivne seos standardhälbe ja lävendtsükli suuruse vahel. Standardhälbe seost sihtmärk DNA kogusega oli märgata ka standardkõvera loomisel, kus

see suuremate lahjenduste juures kasvas. Seetõttu võib väita, et antud metoodika on stabiilsem ja usaldusväärsem madalamate lävendtsükli väärtuste korral. See tähendab, kas suurema sihtmärk DNA koguse või väiksema inhibitsiooni korral. Antud töös kasutatud proovides esines aga väga suur inhibitsiooni mõju ka peale proovide puhastamist. See annab aluse eeldada, et tegelikult võis esineda rohkem *T. bryosalmonae* DNA-d sisaldavaid proove, mida aga tänu madalale märklaudgeeni sisaldusele ja suurele inhibitsioonile ei tuvastatud. Inhibitsiooni mõju võis eriti tugevalt avalduda Altja jõe puhul, mille proovide lävendtsükli väärtused olid tunduvalt kõrgemad kui Mustojas. Lisaks olid pooled Altja jõe positiivsed proovid kahe positiivse koopiaga, mistõttu võib eeldada metoodika väiksemat usaldusväärsust antud jões.

Arvestades, et madalate DNA koguste juures on metoodika ebaefektiivsem, tasuks edaspidises uuringutes keskenduda eoste ja statoblastide, mitte vaba DNA püüdmisele. Eosed ja statoblastid on vähem mõjutatud DNA-d lagundavatest keskkonnateguritest kui vaba DNA, mistõttu on neile keskendudes võimalik tabada suurem kogus märklaudgeeni. Metoodika efektiivsemaks muutmisel võib aidata suurema poorsuse või läbilaskevõimega filtrite kasutamine või eelfiltreerimine, kuna see võib kaasa tuua väiksema inhibiitorite sisalduse proovis. Lisaks väheneks sellisel juhul ka filtrite ummistumine, mis tõstaks tuvastamise tõenäosust. Fontes *et al.* (2017) kasutasid 30 µm võrguga eelfiltreeritud veeproovidest *T. bryosalmonae* eoste tabamiseks 3 µm poori suurusega TN filtreid.

Antud töös kasutatud klaasfiiberfiltrite kinnipidamisvõime oli $\geq 0,7$ µm, sammalloomadelt vabastatud eoste diameeter on aga ~ 20 µm, kaladelt pärinevad eosed on suuresega $\sim 14 \times 16$ µm (Hedrick *et al.* 2004; McGurk *et al.* 2005). Kuna sammalloomadelt ja kaladelt vabaneva eose suurus on erinev, võib tekkida võimalus suuruse järgi eristada kummalt peremehelt eos pärineb. Sellisel juhul tuleks proovivõtukohtade valikul arvestada lõhilaste noorjärkudele sobilike tingimustega. Lisaks mainitud positiivsetele mõjudele kiirendaks suurema läbilaskevõimega filtrid ka filtreerimise kiirust ja muudaks metoodika kasutajasõbralikumaks ning atraktiivsemaks.

Juhinduvalt uuringu tulemustest võiks kokkuvõtvalt metoodika parendamisele kaasa aidata järgnev:

- vähendada filtrite kinnipidamisvõimet ja keskenduda vaid eostele ning statoblastidele;
- proovide eelfiltreerimine;
- koguda proove sügavamalt ja alamjooksudelt;
- testida erinevaid DNA analüüsimeseks vajalikke komponente loodusliku veega;
- leida efektiivsemad DNA puhastamise lahendused erinevates veetüüpides;
- lühendada proovide kogumise ja filtreerimise vahelist aega, võimalusel filtreerida välitööde käigus.

KOKKUVÕTE

Kliima soojenemine ja antropogeensed stressorid on kaasa kutsunud suurenenud PKD puhangud ja nende levila kiirema laienemise. Kuna haigus tekitab üha rohkem muret kogu põhjapoolkeral, pööratakse sellele ka üha enam tähelepanu. PKD tuvastamine traditsiooniliste meetoditega on aga aeganõudev ja küllaltki töömahukas. Sellest lähtuvalt oligi antud töö ülesandeks välja selgitada *T. bryosalmonae* tuvastamise võimalikkus keskkonna DNA ehk eDNA meetodika abil ning pakkuda võimalikku alternatiivi traditsioonilistele proovivõtumeetoditele.

Kasutades erinevaid filtritüüpe, selgus uurimusest rakuvälise DNA (tselluloosnitraatfiltrid) väiksem tuvastamise efektiivsus ja usaldusväärsus, võrreldes parasiidi eoste või nakatunud sammallooma statoblastidega (klaasfiiberfiltrid). Seetõttu kasutati erinevate mõjurite ja haiguse dünaamika hindamisel klaasfiiberfiltrite tulemusi.

Uuringus osalenud veekogudes talitlesid, vaatamata oma geograafilisele lähedusele ja näilisele sarnasusele, erinevad mõjurid mõnevõrra erinevalt. Samamoodi varieerus ka nende mõju kasutatud meetodikale. Seetõttu ei pruugi saavutatud tulemused ja üldistatud järeldused üksüheselt kehtida kõigis keskkonnatingimustes, paikades ning ajas.

Töös ilmnes erinevate tegurite kompleksne koosmõju kasutatud meetodikale ja parasiidi elutegevusele. Sellegi poolest saab välja tuua mõned tegurid, mis omasid lõpptulemuste väljakujunemisel olulist rolli.

PKD ja *T. bryosalmonae* arengus peetakse üheks tähtsamaks teguriks veetemperatuuri. Ka antud töö tulemuste põhjal võib järeldada veetemperatuuri positiivset rolli parasiidi tuvastamisele, kuigi seda mõnevõrra väiksemana kui võinuks arvata. Oodatust väiksem veetemperatuuri positiivne mõju on põhjustatud ilmselt selle tõusmisel veekeskkonnas aset leidvatest muutustest, mis hakkavad pärssima sihtmärk DNA tuvastamist. Kõrgematel temperatuuridel intensiivistuv mikroobne ja ensümaatiline lagunemine võivad vähendada

sihtmärk DNA kättesaadavust, mis niigi kõrge inhibitsiooni juures võisid takistada märklaudgeeni amplifitseerimist.

Uuringus osalenud jõgedes esines väga kõrge inhibitsioon, seda ka peale proovide puhastamist. Inhibitsiooni mõju vähendamine võibki olla võtmeküsimus antud metoodika piisava tundlikkuse ja usaldusväärsuse saavutamiseks.

Lisaks mõjutas *T. bryosalmonae* tuvastamist filtreeritud proovikogus, mis oli veetemperatuuriga negatiivses seoses. Proovikoguse suurenemisel kasvasid nii positiivse tulemuse tuvastamise tõenäosus kui ka sihtmärk DNA kogus. Koos viimasega suureneb ka metoodika usaldusväärsus.

Edukaks metoodika rakendamiseks ei ole vähemtähtis ka proovivõtupaiga ja –metoodika valik. Veekogude lõikes olid parasiidi tuvastamisel selgelt efektiivsemad nende alamjooksud. Kui teooria baasil võiks arvata, et tuvastamise tõenäosus võiks tõusta ka vahetult paisualustel lõikudel, siis antud töö tulemuste põhjal on alust eeldada, et paisud ei panusta otseselt haigustekitajate levikusse. Küll aga tõstsid paisud tunduvalt paisualust veetemperatuuri, soodustades seeläbi sammalloomade ja parasiidi elutegevust.

Kuna eDNA metoodika on suhteliselt uus ja perspektiivikas valdkond, tasub antud uurimust võtta kui eeltööd efektiivse ja usaldusväärse lahenduse välja töötamiseks. Uurimuse tulemusena pakub kirjatöö autor, töö arutelu osas, välja mõningad soovitused, mis võiksid aidata parendada *T. bryosalmonae* tuvastamist eDNA metoodika abil.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abd-Elfattah, A., Kumar, G., Soliman, H., El-Matbouli, M.** (2014). Persistence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) in chronically infected brown trout *Salmo trutta*. *Dis. Aquat. Organ.*, 111 (1). lk 41–49.
- Amberg, J. J., NeCalla, S., Gaikowski, M.** (2013). Understanding Vectors and Fomites and Overcoming Their Challenges in Edna Monitoring. Conference: American Fisheries Society 143rd Annual Meeting.
- Anderson, C. L., Canning, E. U., Okamura, B.** (1999). Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology*, 119 (6). lk 555–561.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., Lodge, D. M.** (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.*, 48 (3). lk 1819–1827.
- Bettge, K., Segner, H., Burki, R., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T.** (2009). Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology*, 136 (6). lk 615–625.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J., Arnett, A., Williams, P., Dunn, F.** (2014). Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. (Defra Project No. WC1067). Oxford: Freshwater Habitats Trust. 142 lk.
- Bissett, A. P., Gibson, J. A. E., Jarman, S. N., Swadling, K. M., Cromer, L.** (2005). Isolation, amplification, and identification of ancient copepod DNA from lake sediments. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 3 (12). lk 533–542.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W., de Bruyn, M.** (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.*, 29 (6). lk 358–367.

- Borsuk, M. E., Reichert, P., Peter, A., Schager, E., Burkhardt-Holm, P.** (2006). Assessing the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers using a Bayesian probability network. *Ecol. Model.*, 192 (1-2). lk 224–244.
- Bruneaux, M., Visse, M., Gross, R., Pukk, L., Saks, L., Vasemägi, A.** (2016). Parasite infection and decreased thermal tolerance: impact of proliferative kidney disease on a wild salmonid fish in the context of climate change. *Funct. Ecol.*, 31 (1). lk 216–226.
- Burkhardt-Holm, P., Giger, W., Guttinger, H., Ochsenbein, U., Peter, A., Scheurer, K., Segner, H., Staub, E., Suter, M. J-F.** (2005). Where have all the fish gone? *Environ. Sci. Technol.*, 39 (21). lk 441–447.
- Burkhardt-Holm, P., Scheurer, K.** (2007). Application of the weight-of-evidence approach to assess the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers. *Aquat. Sci.*, 69 (1). lk 51–70.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M., Okamura, B.** (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47 (5). lk 456–468.
- Canning, E. U., Tops, S. A., Curry, A., Wood, T. S., Okamura, B.** (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49 (4). lk 280–295.
- Carraro, L., Mari, L., Hartikainen, H., Strepparava, N., Wahli, T., Jokela, J., Gatto, M., Rinaldo, A., Bertuzzo, E.** (2016). An epidemiological model for proliferative kidney disease in salmonid populations. *Parasit. Vectors*, 9 (1). 487.
- Carraro, L., Bertuzzo, E., Mari, L., Fontes, I., Hartikainen, H., Strepparava, N., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., Jokela, J., Gatto, M., Rinaldo, A.** (2017). Integrated field, laboratory, and theoretical study of PKD spread in a Swiss prealpine river. *PNAS*, 114 (45). lk. 11992-11997.
- Chen, I., Dubnau, D.** (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 (3). lk 241–249.
- Chilmonczyk, S., Monge, D., de Kinkelin, P.** (2002). Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *J. Fish Dis.*, 25 (4). lk 217–226.

- Corinaldesi, C., Beolchini, F., Dell'anno, A.** (2008). Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Mol. Ecol.*, 17 (17). lk 3939–3951.
- Corinaldesi, C., Barucca, M., Luna, G. M., Dell'anno, A.** (2011). Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in permanently anoxic deep-sea sediments. *Mol. Ecol.*, 20 (3). lk 642–654.
- Darling, J. A., Mahon, A. R.** (2011). From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ. Res.*, 111 (7). lk 978–988.
- Dash, M., Vasemägi, A.** (2014). Proliferative kidney disease (PKD) agent *Tetracapsuloides bryosalmonae* in brown trout populations in Estonia. *Dis. Aquat. Organ.*, 109 (2). lk 139–148.
- de Kinkelin, P., Lorient, B.** (2001). A water temperature regime which prevents the occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 24 (8). lk 489–493.
- de Kinkelin, P., Gay, M., Forman, S.** (2002). The persistence of infectivity of *Tetracapsula bryosalmonae* infected water for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25 (8). lk 477–482.
- Deagle, B. E., Eveson, J. P., Jarman, S. N.** (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.*, 3. 11.
- Deere, D., Porter, J., Pickup, R. W., Edwards, C.** (1996). Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *J. Appl. Bacteriol.*, 81 (3). lk 309–318.
- Deiner, K., Altermatt, F.** (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9 (2).
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C.** (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6 (8).
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C.** (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.*, 49 (4). lk 953–959.
- Dell'Anno, A., Corinaldesi, C.** (2004). Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (7). lk 4384–4386.

- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., Sorensen, P. W.** (2014). The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS ONE*, 9 (11).
- Eichmiller, J. J., Best, S. E., Sorensen, P. W.** (2016). Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environ. Sci. Technol.*, 50 (4). lk 1859-1867.
- El-Matbouli, M., Hoffman, R. W.** (2002). Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease: field studies and exposure experiments. *J. Fish Dis.*, 25 (8). lk 459–467.
- Ellison, S. L., English, C. A., Burns, M. J., Keer, J. T.** (2006). Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.*, 6 (33).
- Evans, N. T., Lamberti, G. A.** (2018). Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fish. Res.*, 197. lk 60–66.
- Evans, N. T., Shirey, P. D., Wieringa, J. G., Mahon, A. R., Lamberti, G. A.** (2017). Comparative cost and effort of fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing. *Fisheries*, 42 (2). lk 90–99.
- Feist S. W., Bucke, D.** (1993). Proliferative kidney disease in wild salmonids. *Fish. Res.*, 17 (1-2). lk 51–58.
- Feist, S. W., Peeler, E. J., Gardiner, R., Smith, E., Longshaw, M.** (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *J. Fish Dis.*, 25 (8). lk 451–458.
- Ficetola, G., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., Taberlet, P., Pompanon, F.** (2010). An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11. 434.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P.** (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, 4 (4). lk 423-425.
- Figuerola, J., Green, A. J., Santamaría, L.** (2003). Passive internal transport of aquatic organisms by waterfowl in Doñana, southwest Spain. *Global Ecol. Biogeogr.*, 12. lk 427–436.
- Filipe, A. F., Markovic, D., Pletterbauer, F., Tisseuil, C., Wever, A. D., Schmutz, S., Bonada, N., Freyhof, J.** (2013). Forecasting fish distribution along stream networks: brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. *Diversity Distrib.*, 19 (8). lk 1059-1071.
- Fontes, I., Hartikainen, H., Holland, J. W., Secombes, C. J., Okamura, B.** (2017). *Tetracapsuloides bryosalmonae* abundance in river water. *Dis. Aquat. Organ.*, 124 (2). lk 145-157.

- Foott, J. S., Hedrick, R. P.** (1987). Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *J. Fish Biol.*, 30 (4). 1k 477–483.
- Foott, J. S., Stone, R., Nichols, K.** (2005). FY2005 Investigational Report: The Effects of Proliferative Kidney Disease on Blood Constituents, Swimming Performance and Saltwater Adaptation in Merced River Hatchery Juvenile Chinook Salmon Used in the 2005 VAMP Study. California. U.S. Fish & Wildlife Service California – Nevada Fish Health Center. 24 1k.
- Freeland, J. R., Noble, L. R., Okamura, B.** (2000). Genetic consequences of the metapopulation biology of a facultatively sexual freshwater invertebrate. *J. Evol. Biol.* 13 (3). 1k 383– 395.
- Garibyan, L., Avashia, N.** (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.*, 133(3). 1k 1-8.
- Gay, M., Okamura, B., de Kinkelin, P.** (2001). Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Dis. Aquat. Org.*, 46 (1). 1k 31–40.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., Wallace, D. C.** (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 (11). 1k 6715–6719.
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., Waits, L. P.** (2011). Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS ONE*, 6 (7).
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., Pilliod, D. S.** (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biol. Conserv.*, 183. 1k 1–3.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., Taberlet, P.** (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.*, Vol. 7 (11). 1k 1299-1307.
- Gorgoglione, B., Kotob, M. H., Unfer, G., El-Matbouli, M.** (2016). First Proliferative Kidney Disease outbreak in Austria, linking to the aetiology of Black Trout Syndrome threatening autochthonous trout populations. *Dis. Aquat. Org.* 119 (2). 1k 117-128.

- Grabner, D. S., El-Matbouli, M.** (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 79 (2). lk 133–139.
- Grabner, D. S., El-Matbouli, M.** (2009). Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Vet. Parasitol.*, 165. lk 200-206.
- Hartikainen, H., Johnes, P., Moncrieff, C., Okamura, B.** (2009). Bryozoan populations reflect nutrient enrichment and productivity gradients in rivers. *Freshw. Biol.*, 54 (11). lk 2320–2334.
- Hartikainen, H., Fontes, I., Okamura, B.** (2013). Parasitism and phenotypic change in colonial hosts. *Parasitology*, 140. lk 1403-1412.
- Hedrick, R. P., Baxa, D. V., de Kinkelin, P., Okamura, B.** (2004). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitol. Res.*, 92. lk 81-88.
- Henderson, M., Okamura, B.** (2004). The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proc. Biol. Sci.*, 271 (1549). lk 1729–1736.
- Herder, J. E., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., van Delft, J. J. C. W., Thomsen, P. F., Taberlet, P.** (2014). Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
- Huggett, J. F., Novak, T., Garson, J. A., Green, C., Morris-Jones, S. D., Miller, R. F., Zumla, A.** (2008). Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res. Notes*, 1 (1). lk 1-9.
- Hutchins, P., Sepulveda, A. J., Martin, R., Hopper, L.** (2017). A probe-based quantitative PCR assay for detecting *Tetracapsuloides bryosalmonae* in fish tissue and environmental DNA water samples. *Conserv. Genet. Resour.* lk 1-3.
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., Letcher, B. H., Whiteley, A. R.** (2015). Distance, flow, and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol. Ecol. Resour.*, 15 (1). lk 216–227.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., Lodge, D. M.** (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.*, 4 (2). lk 150–157.

- Jerde, C. L., Chadderton, W. L., Mahon, A. R., Renshaw, M. A., Corush, J., Budny, M. L., Mysorekar, S., Lodge, D. M.** (2013). Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 70 (4). lk 522–526.
- Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Andruszkiewicz, E. A., Mahon, A. R., Bolster, D., Tank, J. L.** (2016). Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environ. Sci. Technol.*, 50 (16). lk 8770–8779.
- Kent, M. L., Hedrick, R. P.** (1985). PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa. *J. Parasitol.*, 32 (2). lk 254–260.
- King, C. E., Debruyne, R., Kuch, M., Schwarz, C., Poinar, H. N.** (2009). A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *Biotechniques*, 47 (5). lk 941-949.
- Kipp, R., Bailey, S. A., MacIsaac, H. J., Ricciardi, A.** (2010). Transoceanic ships as vectors for nonindigenous freshwater bryozoans. *Divers. Distributions*, 16 (1). lk 77–83.
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., Paukert, C.** (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biol. Conserv.*, 183. lk 77–84.
- Kristmundsson, Á., Antonsson, T., Árnason, F.** (2010). First record of proliferative kidney disease in Iceland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 30 (1). lk 35–40.
- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V., Bernatchez, L.** (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *J. Appl. Ecol.*, 53 (4). lk 1148–1157.
- Laramie, M. B., Pilliod, D. S., Goldberg, C. S.** (2015). Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biol. Conserv.*, 183. lk 29–37.
- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P.** (1998). Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.*, 201 (2). lk 165–168.
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., Dunfeld, K. E.** (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol. Biochem.*, 39 (12). lk 2977–2991.
- Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D. M., Hunter, M. E., Nico, L. G.** (2013). Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of asian carps in controlled and field experiments. *PLoS ONE*, 8 (3).

- Matsui, K., Honjo, M., Kawabata, Z.** (2001). Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26 (1). 1k 95–102.
- McGurk, C., Morris, D. J., Adams, A.** (2005). Microscopic studies of the link between salmonid proliferative kidney disease (PKD) & bryozoans. *Fish Vet. J.*, 8. 1k 62–71.
- McGurk, C., Morris, D. J., Auchinachie, N. A., Adams, A.** (2006). Development of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) in bryozoan hosts (as examined by light microscopy) and quantitation of infective dose to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Parasitol.*, 135 (3-4). 1k 249–257.
- McKelvey, K. S., Young, M. K., Knotek, W. L., Carim, K. J., Wilcox, T. M., Padgett-Stewart, T. M., Schwartz, M. K.** (2016). Sampling large geographic areas for rare species using environmental DNA: a study of bull trout *Salvelinus confluentus* occupancy in western Montana. *J. Fish Biol.*, 88 (3). 1k 1215–1222.
- Marcos-López, M., Gale, P., Oidtmann, B. C., Peeler, E. J.** (2010). Assessing the impact of the climate change on disease emergence in freshwater fish in the United Kingdom. *Transbound Emerg. Dis.*, 57 (5). 1k 293-304.
- Martin, I., Dozin, B., Quarto, R., Cancedda, R., Beltrame, F.** (1997). Computer-based technique for cell aggregation analysis and cell aggregation in in vitro chondrogenesis. *Cytometry*, 28 (2). 1k 141–146.
- Mo, T. A., Jørgensen, A.** (2016). A survey of the distribution of the PKD-parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Cnidaria: Myxozoa: Malacosporea) in salmonids in Norwegian rivers – additional information gleaned from formerly collected fish. *J. Fish Dis.*, 40 (5). 1k 621-627.
- Morris, D. J., Adams, A., Feist, S. W., McGeorge, J., Richards, R. H.** (2000). Immunohistochemical and PCR studies of wild fish for *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX), the causative organism of proliferative kidney disease. *J. Fish Dis.*, 23 (2). 1k 129–135.
- Morris, D. C., Morris, D. J., Adams, A.** (2002). Development of improved PCR to prevent false positives and false negatives in the detection of *Tetracapsula bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease. *J. Fish Dis.*, 25. 1k 483-490.
- Morris, D. J., Ferguson, H. W., Adams, A.** (2005). Severe, chronic proliferative kidney disease (PKD) induced in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* held at a constant 18°C. *Dis. Aquat. Org.*, 66. 1k 221-226.

- Morris, D. J., Adams, A.** (2006a). Proliferative, presaccular stages of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the invertebrate host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *J. Parasitol.*, 92 (5). lk 984–989.
- Morris, D. J., Adams, A.** (2006b). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea), the causative organism of salmonid proliferative kidney disease, to the freshwater bryozoan *Fredericella sultana*. *Parasitol.*, 133 (6). lk 701–709.
- Morris, D. J., Adams, A.** (2007). Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitol. Res.*, 100 (5). lk 983–992.
- Okamura, B., Feist, S. W.** (2011). Emerging diseases in freshwater systems. *Freshw. Biol.*, 56 (4). lk 627–637.
- Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T.** (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshw. Biol.* 56 (4). lk 735–753.
- Opel, K. L., Chung, D., McCord, B. R.** (2010). A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *J. Forensic Sci.* 55 (1). lk 25–33.
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., Avery, M. L.** (2014). Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 14 (2). lk 374–380.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., Waits, L. P.** (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol. Ecol. Resour.*, 14 (1). lk 109–116.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., Waits, L. P., Richardson, J.** (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 70 (8). lk 1123–1130.
- Poulin, R., Paterson, R. A., Townsend, C. R., Tompkins, D. M., Kelly, D. W.** (2011). Biological invasions and the dynamics of endemic diseases in freshwater ecosystems. *Freshw. Biol.*, 56 (4). lk 676–688.
- Pyšek, P., Richardson, D. M.** (2010). Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 35. lk 25–55.
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2016. 5th edition. 71 lk.

- Rannak, L., Arman, J., Kangur, M.** (1983). Lõhe ja meriforell. Tallinn: Valgus. 152 lk.
- Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J.** (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 63 (1-3). lk 88–102.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C., Crispo, E.** (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA — a review of eDNA as a survey tool in ecology. *J. Appl. Ecol.*, 51 (5). lk 1450–1459.
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., Coissac, E.** (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, 39 (21). 145.
- Robin, E. D., Wong, R.** (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, 136 (3). lk 507–513.
- Shapiro, B.** (2008). Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol.*, 26 (6). lk 285–287.
- Skovgaard, A., Buchmann, K.** (2012). Tetracapsuloides bryosalmonae and PKD in juvenile wild salmonids in Denmark. *Dis. Aquat. Organ.*, 101 (1). lk 33-42.
- Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T. T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, H. P., Mo T. A.** (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by Tetracapsuloides bryosalmonae (Myxozoa). *Dis. Aquat. Organ.*, 77 (3). lk 191-198.
- Strand, D. A., Jussila, J., Johnsen, S. I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Viljugrein, H., Engdahl, F., Vrålstad, T.** (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J. Appl. Ecol.*, 51. lk 544–553.
- Strepparava, N., Segner, H., Ros, A., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T.** (2018). Temperature-related parasite infection dynamics: the case of proliferative kidney disease of brown trout. *Parasitology*, 145 (3). lk. 281-291.
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., Goldberg, C. S.** (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.*, 183. lk 85–92.
- Strobel, B., Laramie, M. B., Pilliod, D. S.** (2017). Exploring the Use of Environmental DNA to Determine the Species of Salmon Redds. *North Am. J. Fisheries Mana.*, 37 (5). lk 943-950.

- Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M., Zhang, T.** (2017). Editorial: Antibiotic Resistance in Aquatic Systems. *Front. Microbiol.*, 8. 14.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L. H.** (2012). Environmental DNA. *Mol. Ecol.*, 21 (8). 1k 1789–1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z.** (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PloS ONE* 7 (4).
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H.** (2013). Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One* 8 (2).
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., Willerslev, E.** (2012a). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.*, 21 (11). 1k 2565-2573.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., Willerslev, E.** (2012b). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7 (8).
- Thomsen, P. F., Willerslev, E.** (2015). Environmental DNA — An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, 183. 1k 4–18.
- Tops, S., Lockwood, W., Okamura, B.** (2006). Temperature-driven proliferation of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in bryozoan hosts portends salmonid declines. *Dis. Aquat. Organ.*, 70 (3). 1k 227–236.
- Tops, S., Hartikainen, H., Okamura, B.** (2009). The effects of infection by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) and temperature on *Fredericella sultana* (Bryozoa). *Int. J. Parasitol.*, 39 (9). 1k 1003–1010.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M.** (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.*, 5 (7). 1k 676–684.
- Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P.** (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.*, 24 (2). 1k 110–117.
- Vasemägi, A., Nousiainen, I., Saura, A., Vähä, J. P., Valjus, J., Huusko, A.** 2017. First record of proliferative kidney disease agent *Tetracapsuloides bryosalmonae* in wild brown trout and European grayling in Finland. *Dis. Aquat. Organ.*, 125 (1). 1k 73-78.

- Wahli, T., Knuesel, R., Bernet, D., Segner, H., Pugovkin, D., Burkhardt-Holm, P., Escher, M., Schmidt-Posthaus, H.** (2002). Proliferative kidney disease in Switzerland: current state of knowledge. *J. Fish Dis.*, 25 (8). lk 491-500.
- Wahli, T., Bernet, D., Steiner, P. A., Schmidt-Posthaus, H.** (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Swiss rivers: an update. *Aquat. Sci.*, 69 (1). lk 3–10.
- Wilcove, D. S., Bean, M. J.** (1994). *The big kill: declining biodiversity in America's lakes and rivers.* Washington D. C: Environmental Defense Fund. 275 lk.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., Schwartz, M. K.** (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE* 8 (3).
- Wittwer, C., Stoll, S., Strand, D., Vrålstad, T., Nowak, C., Thines, M.** (2018). eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, 807 (1). lk 87-97.
- Wood, T. S., Okamura, B.** (1999). *Asajirella gelatinosa* in Panama: a bryozoan range extension in the Western Hemisphere (Ectoprocta: Phylactolaemata). *Hydrobiologia*, 390 (1-3). lk 19–23.
- Wood, T. S., Okamura, B.** (2005). *A new key to the freshwater Bryozoans of Britain, Ireland and continental Europe, with notes on their ecology.* The Freshwater Biological Association, Ambleside, United Kingdom.
- Wootten, R., McVicar, A. H.** (1982). Some preliminary observations on proliferative kidney disease in wild brown trout, *Salmo trutta* L., in a Scottish stream. *Bull. Eur. Ass. of Fish Path.*, 2. lk 60–63.
- Zhao, S., Fernald, R. D.** (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.*, 12 (8). lk 1045-1062.
- Zhu, B.** (2006). Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Res.*, 40 (17). lk 3231–3238.
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., Segner, H.** (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquat. Sci.*, 69. lk 11–25.

Veebiallikad

Real-time PCR miner

<http://ewindup.info/miner/> (22.04.2018)

Riigi Ilmateenistus

<https://www.ilmateenistus.ee/> (11.05.2018)

Assessment of eDNA suitability for salmonid parasite (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) detection in watercourses

SUMMARY

Global warming together with the stressors of anthropogenic origin has provoked the extent of the diseases and their impact to the different environmental habitats, including watercourses. One of such disease is the proliferative kidney disease (PKD), which can lead to high mortality rates in juvenile fish, especially in salmonid species. Due to its rapid spreading in northern hemisphere, PKD has gained already a great deal of interest from various fields.

Currently, assessing the distribution of PKD it still depends of the capture-based traditional sampling methods, which are limiting sufficient surveying due to the time consuming, ineffectiveness and also to the financial constraints. The traditional method consist of capturing the live fish from its natural habitat, performing autopsy and later on genetic analysis, which also need much more effort together with invasive sampling. Due to that, PKD monitoring is generally conducted seldom and with small sample sizes, leading to poor knowledge of its possible real distribution estimates. For alternative to traditional methods, this study assessed suitability of environmental DNA (eDNA) for surveying the causative agent (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) of PKD.

Cellulose nitrate filters were used to detect extracellular DNA and glass-fibre filters to detect spores of *T. bryosalmonae*. Better and more reliable results were achieved by using glass-fibre filters. Due to that, assessment of different factors possibly affecting the outcome, were analysed with the results of glass-fibre filters.

In both studied rivers, four sampling sites were used per river and the most effective for detecting *T. bryosalmonae* were the downstream sites. River Altja had one sampling site just after the dam, whereas the river Mustoja had two. In both rivers there was not an increased detection rate in those sites, meaning that the dams are not contributing to

increasing the amount of spores in river water. Although they increased the water temperature, thereby indirectly still contributing to the disease prevalence in the downstream parts of the river.

Temperature is considered to play a lead role in PKD and *T. bryosalmonae* development. The results of current study indicate also the positive effect of the higher temperatures to *T. bryosalmonae* prevalence, though in a quite modest rate. The reason of that probably lies in the environmental factors that hinder the detection of target DNA at higher temperatures. Such as more intense microbic and enzymatic degradation that reduce the availability of target DNA, which at high inhibition rate could have lead to false negatives.

Higher water temperatures also reduced the filtered volume of the samples. The results indicate that filtered volume has positive effect to detection probability and to the amount of the target DNA. With latter the method obtained greater reliability.

Although the studied rivers may seem to be relatively similar, various factors functioned somewhat differently. Therefore the obtained results and conclusions can't be firmly generalised to all riversystems and at all time.

Consequently, due to the fact that eDNA as a method is quite recent, it has already proven to be relatively accurate and promising tool for approaching the PKD agents in multiple natural habitats.

Mina, Siim-Martin Tirmaste,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Keskkonna DNA meetoodika tundlikkuse ja sobivuse hindamine lõhilaste parasiidi (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) monitooringuks“, mille juhendajad on Veljo Kisand ja Siim Kahar,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

Tartus, 22.05.2018

Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)